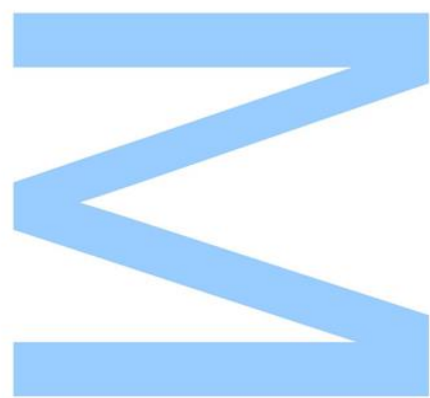


Síntese e funcionalização de nanopartículas de ouro para a formação de bionanoconjugados para o desenvolvimento de biossensores

Diana Araújo Pereira
Mestrado em Química
Departamento Química e Bioquímica
2014

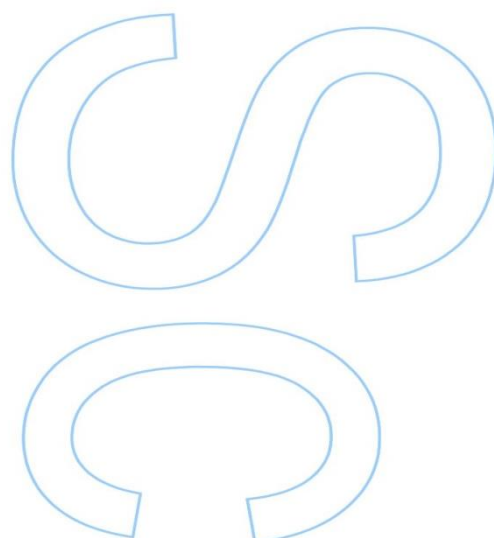
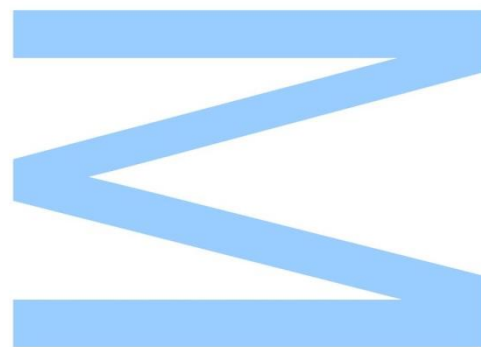
Orientador
Eulalia Pereira, Professora, Faculdade de Ciências



Todas as correções determinadas
pelo júri, e só essas, foram efetuadas.

O Presidente do Júri,

Porto, ____/____/____



Agradecimentos

Desde o início deste trabalho, contei com a confiança e o apoio de inúmeras pessoas.

À Professora Eulalia Pereira, orientadora, agradeço o apoio, principalmente a ajuda, a partilha do saber e as valiosas contribuições para o trabalho. Acima de tudo, obrigada por me acompanhar durante esta jornada e por estimular o meu interesse pelo conhecimento pela ciência e pela vida académica.

Ao Doutor Pedro Quaresma, agradeço pelo apoio e pela força para ultrapassar as dificuldades encontradas durante este trabalho e pelos momentos de descontração proporcionados.

Aos meus colegas de laboratório, Susana, Christian e Ana, pelo apoio e por prescindirem de algum tempo para me ajudar.

A todos, um enorme obrigada pela oportunidade de apreender e contribuir.

À comissão de mestrado, pela disponibilidade para esclarecimento de qualquer dúvida no decorrer no mestrado. Como pela organização do seminário científico em que pode expor uma parte do meu trabalho comunidade científica.

Sou muito grata a todos os meus familiares pelo incentivo recebido ao longo destes anos. Aos amigos de sempre, agradeço o tempo e o sorriso que me dedicaram. Ao Pedro, aos seus familiares pela ajuda e por me apoiarem em todos os momentos.

O meu profundo e sentido agradecimento a todas as pessoas que contribuíram para a concretização desta dissertação, estimulando-me intelectual e emocionalmente.

Resumo

Este trabalho, no âmbito da área da bionanotecnologia, tem como objetivo obter bionanoconjugados de nanopartículas (NPs) de ouro de várias formas com a enzima tirosinase. Para esse efeito realizou-se a síntese de nanopartículas de ouro de forma esférica e de estrela e otimização do processo de síntese. As nanopartículas sintetizadas tinham como agente de revestimento polivinilpirrolidona, (nanoestrelas). De forma a aumentar a biodisponibilidade das nanopartículas usaram-se diferentes métodos de mudança do agente de revestimento de superfície. Para este processo utiliza-se o pentapéptido CALNN e ácido 11-mercaptoundecanóico para substituir o agente de revestimento inicial das nanoestrelas, com o objetivo de melhorar a interação das nanopartículas com proteínas. Foi possível efetuar a troca dos agentes de revestimento (nanoestrelas) utilizados através da aplicação de uma técnica de imobilização de NPs em vidro. A eficácia da substituição do agente de revestimento foi verificada por medição do potencial zeta das nanopartículas, espectroscopia UV-Visível e espectroscopia fotoelectrónica de raios-X.

Após a troca de agente de revestimento, estudou-se a formação de bionanoconjugados com a enzima tirosinase de *Agaricus bisporus* (cogumelo) através de medição de potencial zeta.

Abstract

This work within the field of bionanotechnology, aims to get bionanoconjugates (BNC) with gold NPs of various shapes with the enzyme tyrosinase. To this effect the synthesis of gold nanoparticles of spherical and star shape was performed as well as the optimization of the synthesis procedures. The nanoparticles were synthesized with polyvinylpyrrolidone (nanostars) as capping agents. In order to increase the bioavailability of the nanoparticles used as capping we employed different methods to replace this surface ligand. For this process we used a pentapeptide of sequence CALNN and also 11-mercaptoundecanoic acid to replace the original coating agent present in the NPs. It was possible to exchange the capping agents (nanostars) using a technique requiring the immobilization of NPs in glass. The effectiveness of the exchange of capping agent was checked by measuring the zeta potential of nanoparticles, UV-Visible spectroscopy and X- rays photoelectron spectroscopy.

After the coating agent exchange, the formation of bionanoconjugates with the enzyme tyrosinase from *Agaricus bisporus* (mushroom) was studied by measurements of the zeta potential.

Palavras-chaves

Nanociência

Nanotecnologia

Bionanotecnologia

Nanopartícula

Caracterização

Morfologia

Funcionalização

Agente de revestimento

Bionanoconjugado

Biodisponibilidade

Índice

Índice de Figuras	10
Índice de tabelas	14
Capítulo 1. Introdução	16
1.1 Nanociência na história	16
1.1.1 Nanotecnologia e Bionanotecnologia	17
1.2. Nanopartículas	18
1.2.1 Nanopartículas de ouro.....	18
1.2.2 Propriedades óticas das nanopartículas de ouro	19
1.2.3 Síntese de nanopartículas	22
1.2.3.1 Nanopartículas de ouro esféricas.....	24
1.2.3.2 Síntese das nanoestrelas de ouro.....	24
1.2.4 Funcionalização da superfície das partículas	25
1.2.4.1 Substituição do agente de revestimento	25
1.2.5 Interação entre partículas-proteínas	27
1.3 Propriedades da Tirosinase.....	28
Capítulo 2 - Técnicas de Caracterização	31
2.1 Espectroscopia de UV-Visível	31
2.2 Microscopia de Transmissão Eletrónica	31
2.3 Dispersão de luz dinâmica (DLS)	32
2.4 Potencial zeta.....	34
2.5 Espetroscopia fotoeletrónica de raios X (XPS)	35
2.6 Nanoparticle Tracking Analysis (NTA)	36
Capítulo 3- Procedimento experimental.....	38
3.1 Materiais e reagentes	38
3.2 Síntese das nanopartículas	38
3.2.1 Síntese de nanopartículas esféricas de 15 nm, AuNPs.....	39
3.2.2 Síntese de nanoestrelas de ouro, AuNS@PVP e AuNS@Citrato.....	39
3.2.2.1 Nanoestrelas de ouro resvestidas com PVP, AuNS@PVP	40

3.2.2.2 Nanoestrelas de ouro revestidas com citrato, AuNS@Citrato	40
3.3 Funcionalização das nanopartículas de ouro usando o pentapéptido CALNN e MUA.....	41
3.3.1 Funcionalização das nanoestrelas, AuNS@PVP, com pentapéptido CALNN	42
3.3.2 Funcionalização das AuNS@PVP com o ácido 11-mercaptoundecóico (MUA) por incubação a temperatura elevada.....	42
3.3.3 Funcionalização das AuNS@PVP com o ácido 11-mercaptoundecóico (MUA) por imobilização das partículas em vidro.	43
3.3.4 Funcionalização da nanoestrelas de ouro (AuNS@Citrato) com MUA.	43
3.4 Bionanoconjugados (BNC) construído NS com a proteína tirosinase	44
3.4.1. Determinação da concentração da proteína tirosinase.....	44
3.4.2 Bionanoconjugado, estrutura das AuNS@PVP e AuNS@Citrato revestido com tirosinase.....	46
3.5 Instrumentação e métodos de caracterização	47
3.5.1 Espectroscopia UV-Visível.....	47
3.5.2 Microscopia de transmissão eletrónica (TEM).....	47
3.5.3 Medição por dispersão de luz (DLS)	47
3.5.4 Medições de potencial zeta (ζ)	47
3.5.5 Análise por XPS.....	48
3.5.6 Medição por NTA.....	48
Capítulo 4 – Síntese e caracterização de NPs	49
4.1 Síntese e caracterização das nanopartículas de 15 nm - <i>seeds</i>	49
4.2 Síntese e caracterização de nanoestrelas com PVP, AuNS@PVP	52
4.3 Síntese e caracterização de nanoestrelas de ouro usando AgNO ₃ e ácido ascórbico, AuNS@Citrato	59
Capítulo 5 - Funcionalização das AuNS	65
5.1. Funcionalização das AuNS@PVP	65
5.1.1 Funcionalização das AuNS@PVP com o pentapéptido CALNN.....	66

5.1.2 Funcionalização das AuNS@PVP com ácido 11-mercaptoundenóico (MUA) por incubação a temperatura elevada.....	74
5.1.3 Funcionalização das AuNS@PVP com ácido 11-mercaptoundenóico (MUA) por imobilização das partículas em vidro.	78
5.2 Funcionalização de nanoestrelas de ouro (AuNS@Citrato) com MUA.	81
Capítulo 6 – Bionanoconjugados de NS e proteína tirosinase	89
Capítulo 7 - Conclusão	94
7.1 Considerações Finais	94
7.2 Perspetivas futuras.....	95
8. Referências	97

Índice de Figuras

Figura 1. Dimensões de algumas estruturas moleculares e materiais expressas em nanómetros. ²	16
Figura 2. Imagem de um vitral da idade média. ³	16
Figura 3. Esquema representando várias áreas de aplicação dos nanomateriais.	18
Figura 4. Representações esquemáticas da célula unitária estrutural do ouro (figuras da esquerda) e da sua malha cristalina (figura da direita). ¹²	19
Figura 5. Fotografia de frasquinhos contendo soluções coloidais de nanopartículas de ouro com diferentes tamanhos (da esquerda para a direita: 15, 30, 50, 90 e 150 nm), onde se pode verificar a relação entre a cor da solução coloidal e o tamanho da partícula. As esferas em baixo apresentam-se como escala comparativa dos tamanhos. ¹⁴	19
Figura 6. Espectros de UV-vis de soluções coloidais de NPs de ouro com diferentes tamanhos e formas.	20
Figura 7. Imagem de TEM de um exemplo de nanopartículas anisotrópicas, nanoestrelas de ouro, estudadas neste trabalho. A figura inserida à direita representa uma ampliação da imagem marcada na figura da esquerda.	21
Figura 8. Espectros de UV-Vis obtidos para a síntese de nanoestrelas com diferentes razões entre a concentração de núcleos de cristalização de ouro (NPs esféricas de 30 nm) e a concentração de sal de ouro adicionada na síntese. As imagens B, C e D são referentes, respetivamente, a nanoestrelas sintetizadas com razões molares de 1,67, 11,25 e 20.....	22
Figura 9. Esquema das duas categorias de sínteses de nanopartículas.....	22
Figura 10. Estruturas moleculares de diferentes agentes de revestimento como polivinilpirrolidona (A) e anião citrato (B).....	26
Figura 11. Estruturas moleculares dos agentes de revestimento tiolados ácido mercaptoundecanóico (A) e pentapéptido CALNN (B).	26
Figura 12. Esquema da ligação do péptido à superfície de uma NP, neste caso as NS.	27
Figura 13. Estrutura do bionanoconjugado em que a proteína encontra-se na soft corona (afastado da partícula) enquanto agente de revestimento encontra-se na hard corona (próximo da partícula).	28
Figura 14. Imagem do cogumelo <i>Agaricus bisporus</i>	29
Figura 15. Estrutura da cadeia proteica codificada pelo gene ppo3 da enzima Tirosinase do <i>Agaricus bisporus</i> obtida por difração de Raio-X. ⁴⁴	29

Figura 16. Estrutura tridimensional da tirosinase de <i>Agaricus bisporus</i> e as suas subunidades H1 (verde), H2 (vermelho), L1 (azul) e L2 (rosa) obtida por difração de raio-X. ⁴⁹	30
Figura 17. Esquema das reações da atividade enzimática da tirosinase usando monofenóis e defenóis. ⁵²	30
Figura 18. Esquema que descreve a camada de Stern que representa a relação dos diferentes potenciais em torno da partícula. ⁵⁹	34
Figura 19. Esquema representativo da deteção dos eletrões após a emissão de um feixe de raio-X. ⁶¹	36
Figura 20. Representação do funcionamento do aparelho de NTA. ⁶³	37
Figura 21. Regressão linear obtida a partir da concentração e absorvância das soluções proteicas de BSA	45
Figura 22. Espectros das nanopartículas de ouro de 15 nm com os agentes de revestimento citrato e PVP. A figura inserida é uma fotografia da solução de <i>seeds</i> revestidas com PVP.....	50
Figura 23. Imagem de TEM das AuNPs de 15 nm revestidas com citrato e o respetivo histograma de distribuição de diâmetros.....	50
Figura 24. Dispersão do tamanho das NPs revestidas com citrato numa medição de diâmetro médio por DLS tendo em conta a percentagem de intensidade.	51
Figura 25. Espectros das soluções coloidais de NSs para as sínteses efetuadas com razões de concentração molares de 15, 30, 45 e 60.....	52
Figura 26. Imagens obtidas por TEM de nanoestrelas sintetizadas com razões molares de 15 (A) e 60 (B).	54
Figura 27. Espectros das NSs de razão 60 da síntese de 15 mL e 30 mL. O espectro foi normalizado a 400 nm.	55
Figura 28. Imagem de TEM de uma amostra da solução de NSs da síntese de 15 mL(A) e 30 mL (B) e o respetivo histograma de tamanhos (à direita).	56
Figura 29. Representação gráfica da concentração de NPs por diâmetro obtida por NTA, através da média de 6 leituras consecutivas.....	57
Figura 30. Esquema do procedimento de síntese das AuNS@Citrato. ³⁷	60
Figura 31. Espectros das AuNS@Citrato com e sem a adição de HCl na síntese.....	61
Figura 32. Imagens de TEM das NSs sintetizadas com HCl (A) e o respetivo histograma da distribuição de tamanho (à direita em cima) e das NSs sintetizadas sem HCl (B) e o respetivo histograma da distribuição de tamanhos (à direita em baixo).	62

Figura 33. Comparação dos espectros das AuNS@Citrato após a síntese (A), com ajuste de pH e posterior lavagem (B) e com ajuste de pH e adição de citrato e posterior lavagem.	63
Figura 34. Estrutura química dos agentes de revestimento PVP e CALNN.	65
Figura 35. Espectros do sobrenadante das lavagens da solução coloidal das NSs. ..	66
Figura 36. Esquema do procedimento utilizado para a funcionalização das partículas com CALNN.	67
Figura 37. Espectro das AuNS para uma gama de pH entre 3 e 7 a diferentes tempos após a adição de CALNN: (A) Antes da adição, (B) 3 dias, (C) 5 dias e (D) 7 dias após a adição.	69
Figura 38. Evolução do potencial zeta das NSs com CALNN no decorrer da incubação.	70
Figura 39. Espectros das NS@PVP e NS@CALNN o pH 5 e 6.	71
Figura 40. Gráfico com a o potencial zeta das NPs com PVP e CALNN ao diferente pH (3-7).	72
Figura 41. Distribuição do potencial zeta das NS@PVP e NS@CALNN ao pH 7.	72
Figura 42. Espectros do elemento Au (4f) no meio, N (1s) em cima e S (2p) em baixo, em que a linha a preto representa o espectro ajustado enquanto o azul apresenta os espectros obtidos a partir da análise de XPS.	73
Figura 43. Estrutura molecular do ácido 11-mercaptopundecanoíco (MUA).	75
Figura 44. Esquema do método B para a funcionalização das NS@PVP com o agente de revestimento MUA.	75
Figura 45. Espectros das NSs com MUA e PVP após tratamento com ultrassons, árgon e incubação a 40 °C durante a noite.	76
Figura 46. Variação do potencial zeta para os vários excessos molares (em cima). Distribuição do potencial zeta das soluções coloidais NS@PVP e NS@MUA.	77
Figura 47. Procedimento da funcionalização das NSs com MUA pelo método de imobilização de partículas no vidro.	78
Figura 48. Espectros do sobrenadante das NSs durante o processo de adsorção das partículas.	79
Figura 49 Imagem das AuNSs iniciais (esquerda) e adsorvidas ao vidro (direita).	79
Figura 50. Espectros da NSs antes (preto) e depois (azul) do processo de funcionalização com MUA.	80
Figura 51. Distribuição do potencial zeta para das AuNS@PVP e AuNS@MUA.	81
Figura 52. Espectros das AuNSs com as várias razões de excesso molar entre NSs e MUA comparando com as AuNS@Citrato.	82

Figura 53. Espectros que demonstra a evolução da estabilidade da dispersão coloidal das AuNS@Citrato (em cima) e AuNS@MUA (em baixo) na presença do nitrato de potássio a diferentes concentrações.....	85
Figura 54. Alteração da coloração das soluções coloidais de AuNS@Citrato (A) e AuNS@MUA (B) com as diferentes concentrações de KNO ₃	86
Figura 55. Evolução dos espectros das AuNS@citrato (em cima) e as AuNS@MUA 10X (em baixo) funcionalizadas com MUA, durante 24 horas.	87
Figura 56. Variação da coloração das soluções coloidais (com MUA e citrato) após a síntese e 24 horas depois.	88
Figura 57. Imagem retirada do programa VMD da proteína tirosinase (ficheiro pdb 2Y9W) em que mede a distância máxima das extremidades da proteína (esquerda) e a estrutura volumosa da tirosina de forma a identificar a sua forma aproximada (direita). ⁷⁴	89
Figura 58. Variação do potencial zeta com o pH de AuNS@PVP e AuNS@MUA (método de Liz Márzan) e para os respetivos bionanoconjugados com rácio molar de 50 de tirosinase por NP.	90
Figura 59. Variação do potencial zeta com o aumento do pH de AuNS@PVP e AuNS@MUA (obtidas pelo método de Liz-Márzan) e para os respetivos bionanoconjugados com rácio molar de 200 de tirosinase por NP.	91
Figura 60. Variação do potencial zeta com o pH de AuNS@MUA (método de Vo Dinh) e para os respetivos bionanoconjugados com rácio molar de 50 e de 200 de tirosinase por NP.	92

Índice de tabelas

Tabela 1. Tabela das soluções coloidais contendo diferentes concentração do sal inorgânico, KNO_3 .	44
Tabela 3. Comprimentos de onda do máximo das bandas plasmónicas e razões de absorvância entre a plasmónica a maiores comprimentos de onda (pontas) e a plasmónica a menores comprimentos de onda (núcleo) para os diferentes rácios molares estudados (15, 30, 45, 60).	53
Tabela 5. Tamanho das NSs das diferentes sínteses determinada por TEM.	56
Tabela 6. Valores médios do diâmetro hidrodinâmico (NTA) e diâmetro medido por TEM das NSs obtidas com uma razão molar de 60.	57
Tabela 7. Concentração obtida a partir da técnica NTA, coeficiente de extinção molar calculado utilizando a absorvância aos 450 nm e o valor de literatura da extinção molar para NPs esféricas com o mesmo diâmetro das NS.	58
Tabela 8. Valores da extinção molar das NPs de 15 nm a partir da absorvância do pico (528 nm) e das NSs de 86 nm a partir da absorvância da banda referente ao núcleo (578 nm).	59
Tabela 9. Dados estatísticos referentes às NSs sintetizadas com e sem HCl.	62
Tabela 10. Valores dos picos do espectro do Au, C e N ajustados.	74
Tabela 11. Valores de potencial zeta das NSs funcionalizadas com os vários excessos molares de MUA comparativamente com as nanoestrelas com citrato.	83
Tabela 12. Tabela com a composição das soluções coloidais usadas para o estudo de agregação com sal, KNO_3 .	84

Lista de abreviaturas

AuNS@PVP - nanoestrelas de ouro revestidas com polivinilpirrolidona

AuNS@MUA - nanoestrelas de ouro revestidas com ácido 11-mercaptoundecanóico

AuNS@CALNN - Nanoestrelas de ouro revestidas com CALNN

AuNS@Citrato - nanoestrelas de ouro e prata revestidas com citrato

BNC - Bionanoconjugados

CFC - Cúbica de face centrada

CTAB - Brometo de cetiltrimetilamónio

DLS - Dispersão dinâmica de luz

MUA - ácido 11-mercaptoundecanóico

NPs – Nanopartículas

NSs- Nanoestrelas

NTA - *Nanoparticle Tracking Analysis*

PVP - Polivinilpirrolidona

TEM - Microscopia de transmissão eletrónica

XPS - Espectroscopia de fotoelectrões de raios-x

Capítulo 1. Introdução

1.1 Nanociência na história

A nanociência é a ciência que desenvolve materiais à escala nanométrica ou seja na escala de 1-100 nanómetros, em que 1 nm equivale a 10^{-9} m.¹ A figura 1 apresenta esquematicamente a dimensão de alguns objetos expressa em nanómetros.

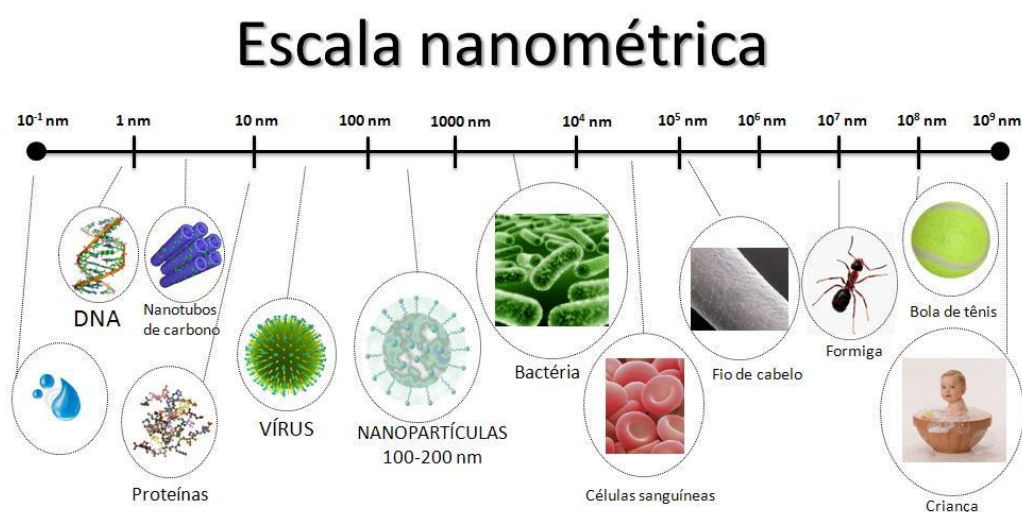


Figura 1. Dimensões de algumas estruturas moleculares e materiais expressas em nanómetros.²

As primeiras aplicações de objetos com estas dimensões, data da época dos romanos que utilizavam nanopartículas (NPs) de ouro e prata para dar diferentes cores ao vidro, conforme a orientação da incidência da luz, tendo esta aplicação continuado na produção de vitrais na idade média (figura 2).¹



Figura 2. Imagem de um vitral da idade média.³

Os fenómenos óticos associados aos objetos à nanoescala só começaram a ser estudados por Michael Faraday no século XIX, com a redução de soluções aquosas de cloreto de ouro em meio bifásico de H_2O/CS_2 para obter soluções coloidais de ouro. A manipulação à escala nanométrica foi proposta em 1959, pelo físico Richard Feynman, verificando pela primeira vez as suas potencialidades. A aplicação do termo nanotecnologia só foi feita pela primeira vez por K. Eric Drexler nos anos 80 que definiu as potencialidades das nanociências e a sua investigação de forma abrangente que descreve no seu livro “Engines of Creation”.⁴

A nanotecnologia é a designação atribuída à produção e manipulação de nanomateriais e materiais nanoestruturados que têm propriedades que estão diretamente relacionadas com o seu tamanho. Para o estudo destas propriedades reúne-se o conhecimento de várias áreas científicas como química, física, engenharia, biologia, medicina entre outras, tornando-se uma ciência multidisciplinar.

1.1.1 Nanotecnologia e Bionanotecnologia

Os materiais de escala nanométrica têm várias aplicações na área da biotecnologia devido às diferentes propriedades físicas e químicas, dependentes da morfologia dos nanomateriais, podendo interagir de forma vantajosa com biomoléculas e moléculas orgânicas (às quais se podem também ligar biomoléculas).⁵

Os nanomateriais têm sido sintetizados através de numerosos métodos com o objetivo de alterar o seu tamanho e a sua forma dando-lhe assim diferentes propriedades adequadas à sua aplicação específica. Estas aplicações aparecem em diferentes áreas, como na indústria têxtil e alimentar, na produção e criação de cosméticos, na engenharia ambiental, entre outras, de forma a melhorar a qualidade de vida da sociedade.¹¹ Na figura 3 apresenta-se um esquema com algumas das principais aplicações de nanomateriais. Por exemplo, podem ser aplicados nanomateriais em sensores de forma a reconhecer biomoléculas num sistema biológico, como catalisadores de forma a melhorar o rendimento de sínteses químicas e também como marcadores do percurso do de um fármaco no organismo.^{6 7}

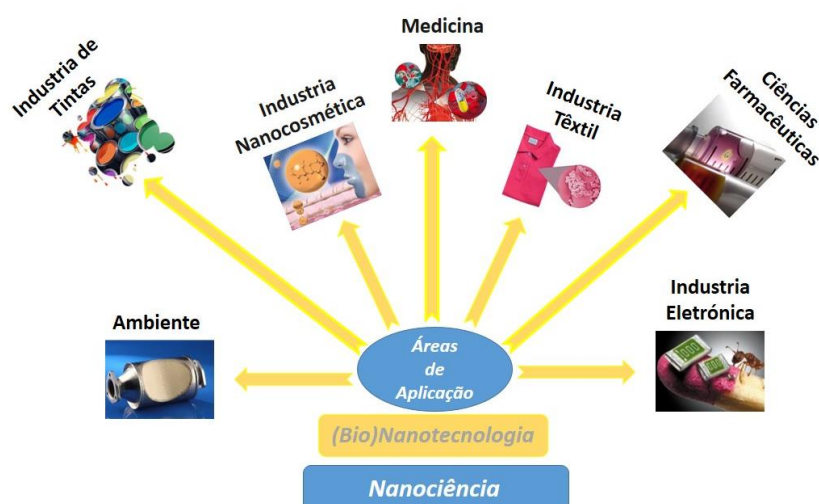


Figura 3. Esquema representando várias áreas de aplicação dos nanomateriais.

Na última década, o aumento do interesse pela bionanotecnologia permitiu um grande avanço que está diretamente relacionado com a necessidade de dar uma resposta rápida às necessidades da sociedade. Essas necessidades têm sido muito notórias ao nível biomédico, tanto no tratamento de doenças como no seu diagnóstico, por exemplo na reparação dos tecidos para melhor compatibilidade dos implantes com o organismo receptor e deteção de microrganismos, como por exemplo microbactérias responsáveis pela tuberculose.^{8 9}

1.2. Nanopartículas

As nanopartículas mais estudadas são de metais, nomeadamente ouro, prata, cobre, platina, titânio e cobalto ou mistura de metais, como titânio com revestimento em ouro, e podem apresentar diferentes formas como esferas, triângulos, cubos, estrelas e elipses, com tamanho que pode variar entre 1-100 nm dependendo da sua aplicação e do tipo de síntese utilizada para a sua formação.^{10 11} Existe também um quantidade considerável de tipos de NPs não metálicas como de sílica, óxidos metálicos, semicondutores, polímeros e outras NPs orgânicas.

1.2.1 Nanopartículas de ouro

O ouro é um elemento químico do grupo dos metais nobres apresentando baixa reatividade. A sua forma cristalina mais estável à temperatura ambiente apresenta uma estrutura cúbica de face centrada, estrutura representada na figura 4.

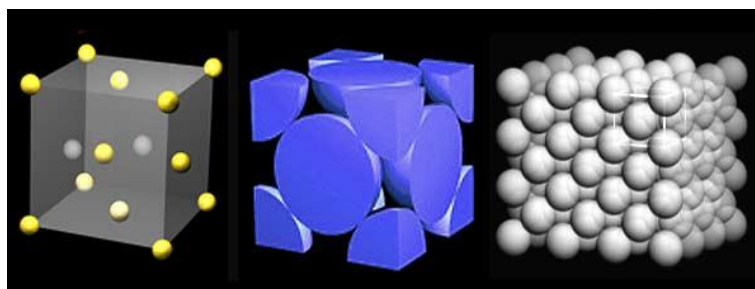


Figura 4. Representações esquemáticas da célula unitária estrutural do ouro (figuras da esquerda) e da sua malha cristalina (figura da direita).¹²

Este elemento metálico apresenta características muito especiais: além de se tratar de um metal inerte, não sofrendo oxidação por contacto com o ar e com a água apresenta elevada condutividade elétrica, sendo por exemplo utilizado para banhar peças de aparelhos elétricos.¹³

O ouro tem tido nos últimos anos uma elevada utilização na área da nanotecnologia e bionanotecnologia devido à sua baixa reatividade, embora as NPs de ouro apresentem maior reatividade em relação ao material *bulk*, e às propriedades óticas especiais das suas NPs. Estas propriedades óticas dependem da forma e tamanho das NPs, apresentando uma variedade de cores desde o vermelho intenso, verde, azul ou violeta (figura 5).

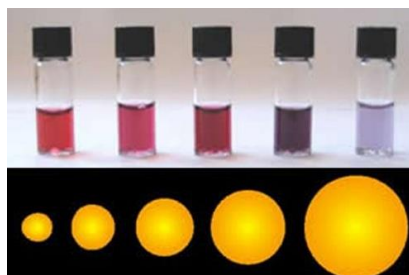


Figura 5. Fotografia de frasquinhos contendo soluções coloidais de nanopartículas de ouro com diferentes tamanhos (da esquerda para a direita: 15, 30, 50, 90 e 150 nm), onde se pode verificar a relação entre a cor da solução coloidal e o tamanho da partícula. As esferas em baixo apresentam-se como escala comparativa dos tamanhos.¹⁴

Este tipo de NPs tem elevada aplicação a nível da medicina, bioengenharia e química biológica, sendo aplicada em testes de diagnóstico e sido propostas para o tratamento de determinadas doenças, por exemplo cancro.¹⁵

1.2.2 Propriedades óticas das nanopartículas de ouro

As NPs de ouro têm mostrado propriedades interessantes e com elevada aplicabilidade em distintas áreas, principalmente o comportamento ótico diferenciado que depende da forma e tamanho e o seu elevado coeficiente de extinção molar (da ordem de 10^6 - 10^9 $M^{-1}.cm^{-1}$).¹⁶ Este fenómeno ótico deve-se à interação da radiação eletromagnética com os eletrões da superfície do metal e designa-se por ressonância plasmónica de superfície. Este fenómeno ocorre quando a partícula metálica é exposta a radiação eletromagnética, levando a que o campo eletromagnético oscilatório da luz induza uma oscilação coerente e coletiva dos eletrões da banda de condução do metal.¹⁷ A teoria de Mie descreve este processo, com uma solução analítica completa usando as equações de Maxwell para a dispersão de radiação electromagnética por partículas esféricas.¹⁸ O comprimento de onda ao qual se verifica o máximo da banda plasmónica depende dos factores que afetam a densidade de carga eletrónica na superfície da partícula, tais como o tipo de metal, forma, estrutura, tamanho, composição e a constante dielétrica do meio (Figura 6). A ressonância plasmónica de superfície dá origem a uma absorção intensa da luz incidente que pode ser detetada e medida usando um espectrofotómetro de UV-Visível.^{19 20 21}

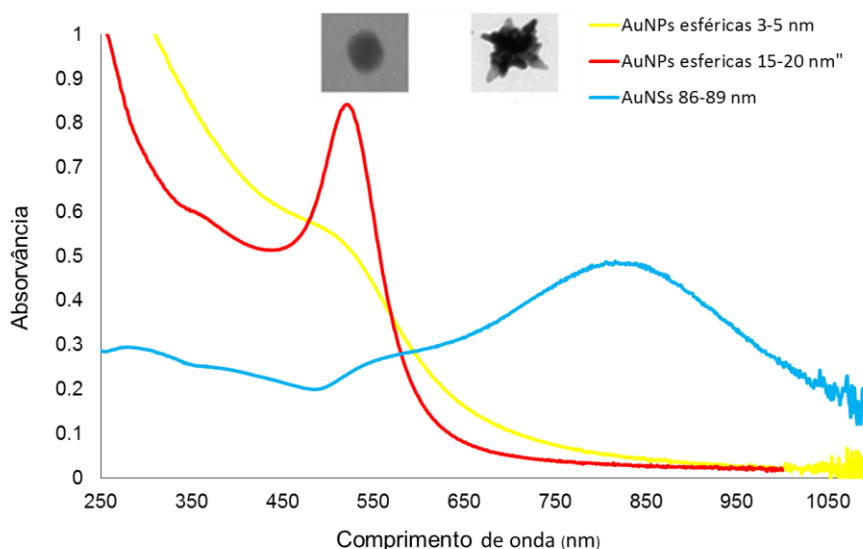


Figura 6. Espectros de UV-vis de soluções coloidais de NPs de ouro com diferentes tamanhos e formas.

As nanopartículas de ouro podem ser isotrópicas ou anisotrópicas, dependendo da sua forma. As nanopartículas de ouro isotrópicas, de forma esférica (AuNPs), com diâmetros entre 5 nm e 20 nm apresentam uma única banda plasmónica típica a 510-525 nm.²² Estas partículas são utilizadas na síntese de algumas partículas anisotrópicas, por exemplo nas nanoestrelas de ouro (AuNSs) que foram estudadas neste trabalho (Figura 7). Estas nanoestrelas têm uma forma que pode ser descrita sucintamente como

um núcleo esférico do qual apresentam várias extremidades com uma forma de prisma triangular irregular (pontas). As partículas anisotrópicas apresentam normalmente mais que uma banda plasmónica.

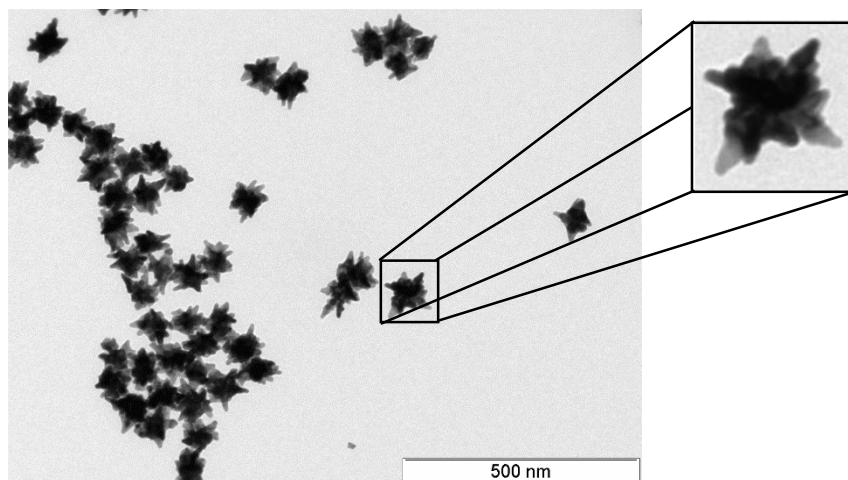


Figura 7. Imagem de TEM de um exemplo de nanopartículas anisotrópicas, nanostrelas de ouro, estudadas neste trabalho. A figura inserida à direita representa uma ampliação da imagem marcada na figura da esquerda.

As AuNSs apresentam uma ressonância plasmónica mais complexa devido à hibridação da ressonância plasmónica das pontas e do núcleo. Isto leva a que experimentalmente as nanostrelas apresentem duas bandas distintas, uma banda larga e intensa centrada entre 700 e 800 nm (pontas) e outra banda menos intensa com o máximo compreendido entre os 500 e 600 nm (núcleo). Como se descreve na figura 8 dependendo da razão entre a concentração das *seeds* e a concentração do sal (HAuCl_4), as nanostrelas apresentam espectros, morfologia e pontas distintas.^{23 35}

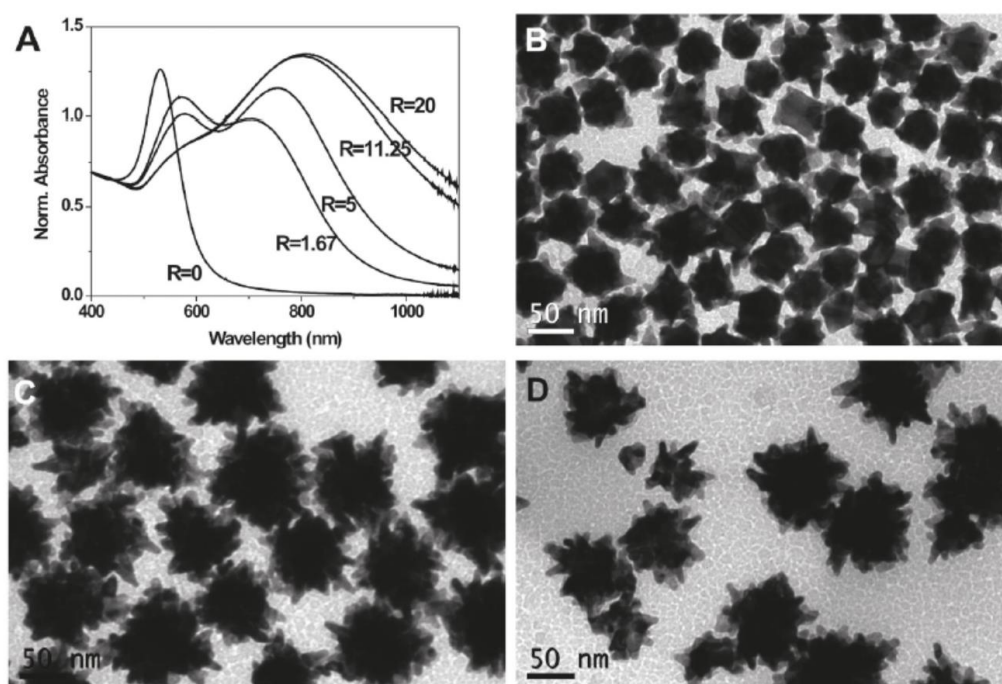


Figura 8. Espectros de UV-Vis obtidos para a síntese de nanoestrelas com diferentes razões entre a concentração de núcleos de cristalização de ouro (NPs esféricas de 30 nm) e a concentração de sal de ouro adicionada na síntese. As imagens B, C e D são referentes, respetivamente, a nanoestrelas sintetizadas com razões molares de 1,67, 50, 11,25 e 20.³⁵

A cor da dispersão coloidal destas nanopartículas, azul, é bem diferente da cor das partículas que lhe dão origem, vermelho intenso, demonstrando a dependência considerável da cor da solução coloidal com a morfologia das nanopartículas.

1.2.3 Síntese de nanopartículas

Para a formação das nanopartículas pode utilizar-se uma vasta gama de técnicas apresentando diferentes graus de qualidade, custo, rapidez e aplicação. Estas técnicas podem dividir-se em duas categorias: *bottom-up* e *top-down* que abordam a produção destes nanomateriais de forma diferente e cujos princípios se apresentam esquematicamente, na figura 9.

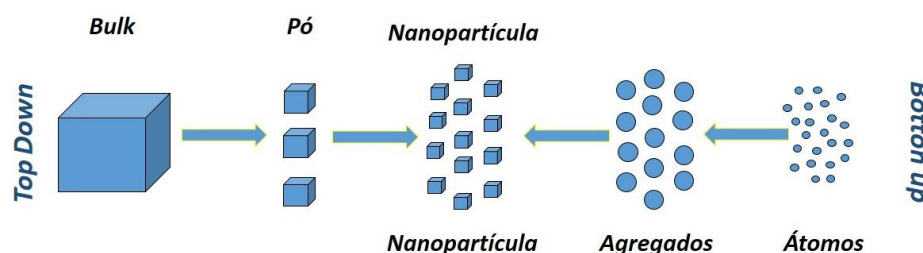


Figura 9. Esquema duas categorias de sínteses de nanopartículas.

A técnica de *bottom up* baseia-se em processos químicos de síntese de nanomateriais através de crescimento das suas unidades constituintes por intermédio de reações químicas, tais como, a redução de iões metálicos ou a precipitação de óxidos ou outros compostos iónicos. As reações utilizadas na técnica de *bottom up* podem ser de decomposição térmica, fotocatalítica, fotoquímica, redução química e eletroquímica, etc.^{24 25 26 27}

Este método pode ser bastante eficaz, caso as unidades constituintes se depositem de uma forma organizada em estruturas bem definidas. Estas técnicas são usualmente de fácil aplicabilidade, obtêm-se bons rendimentos e têm baixos custos energéticos, apresentando apenas a desvantagem de se obter usualmente uma maior dispersão do tamanho das NPs em relação aos métodos *top down*.²⁸

Os métodos de *top down* baseiam-se em processos físicos de desintegração de um material macroscópico para obter um nanomaterial com a morfologia adequada para determinada aplicação.²⁹ Nestes processos ocorre usualmente elevada remoção do material, pelo que apresentam baixos rendimentos. Este conjunto de técnicas permitem a preparação de NPs com tamanho e dispersão bem definida. Além disso, contrariamente aos métodos *bottom up*, as partículas obtidas não têm qualquer revestimento pelo que se pode modificar a sua superfície de forma mais simples e rápida. Por sua vez estes processos, além de baixos rendimentos, têm a desvantagem de terem elevado consumo energético e não ser usualmente fáceis de adaptar a largas escalas de produção.³⁰

De forma geral nos métodos *bottom up* existem duas fases principais na síntese de nanopartículas: a fase de nucleação e a fase de crescimento. Na nucleação ocorre a formação de pequenos núcleos metálicos a partir das moléculas de precursor, quando a concentração destas se encontra acima de um limiar de nucleação. Na fase de crescimento ocorre a deposição de átomos metálicos livres nos núcleos formados durante a fase de nucleação, provocando assim o seu crescimento. A dispersão de tamanhos de uma população de NPs depende fortemente da duração relativa entre estas fases de nucleação e crescimento. De maneira a obter uma população monodispersa de NPs é importante ter um período de nucleação curto e separado da fase de crescimento para que haja uma formação quase simultânea de núcleos seguido de um crescimento homogéneo, visto que o número final de NPs formadas é determinado durante a fase de nucleação.^{31 32 33}

Deste modo o controlo do tamanho e da morfologia das partículas pode ser conseguido através da modulação dos processos de nucleação e crescimento. Uma das

maneiras de conseguir este controlo sobre o processo é controlar a quantidade de átomos de precursor disponíveis e/ou introduzir moléculas com afinidade para a superfície da partícula em formação, com o objetivo de abrandar o crescimento da partícula (ou no caso de partículas anisotrópicas, apenas de certas facetas cristalográficas). Estas moléculas adsorvidas à superfície têm ainda a vantagem de conferir estabilidade coloidal à partícula formada, quer pela existência de grupos carregados positiva ou negativamente, quer pela existência de grupos funcionais com elevada afinidade para o solvente.

Neste trabalho efetuaram-se algumas sínteses de nanopartículas de ouro com diferentes formas e tamanho. Nas subsecções seguintes descreve-se sucintamente a abordagem sintética utilizada em cada caso.

1.2.3.1 Nanopartículas de ouro esféricas

Para a síntese de nanopartículas de ouro esféricas com cerca de 15 nm, recorreu-se ao método de redução por citrato descrito por Turkevich,³⁴ na qual se usa como precursor metálico o ácido tetracloroáurico ($\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$), em solução aquosa e em que se usa citrato de sódio ($\text{Na}_3(\text{C}_3\text{H}_5\text{O}(\text{COO})_3)$) simultaneamente como agente redutor e agente de revestimento. A redução do precursor de Au(III) é efetuada à temperatura de ebulição, em refluxo, usando um excesso de citrato de sódio. À medida que vão formando nanopartículas, o citrato adsorve à sua superfície, conferindo uma carga superficial negativa, o que previne a agregação das partículas devido às repulsões electroestáticas.

1.2.3.2 Síntese das nanoestrelas de ouro

Estas NPs foram obtidas através de dois métodos de síntese distintos:

Método de Liz-Marzán, AuNS@PVP

Neste método as nanoestrelas foram obtidas através da adição de AuNPs de 15 nm (seeds) revestidas com polivinilpirrolidona (PVP) a uma solução de ácido tetracloroáurico em dimetilformamida (DMF) na presença de elevada concentração de PVP (método de Liz-Marzán). Neste método o solvente funciona também como redutor, quando na presença de elevadas concentrações de PVP.^{35 36} O PVP é usado como agente de revestimento conferindo estabilidade coloidal às partículas em água e etanol, mas também tem uma função imprescindível na orientação do crescimento das pontas.

Método de Tuan Vo-Dinh, AuNS@Citrato

No segundo método utilizam-se também AuNPs de 15 nm como *seeds*, desta vez revestidas por citrato, numa solução aquosa de ácido tetracloreáurico. Seguidamente é adicionado, em simultâneo, soluções de ácido ascórbico e nitrato de prata. Neste caso o ácido ascórbico funciona como agente redutor ao passo que o catião prata favorece a formação das pontas da estrela, ao depositar-se em zonas específicas da partícula de ouro, orientando assim o crescimento das pontas das estrelas.³⁷

1.2.4 Funcionalização da superfície das partículas

A interação das nanopartículas com o exterior é obviamente mediada pelas características químicas da sua superfície. Assim, para a maior parte das aplicações é essencial controlar estas características. Na síntese de nanopartículas por métodos de *bottom up* usa-se normalmente um agente de revestimento que pode ter essa função, mas quando a ligação do agente de revestimento à partícula é fraca (ou seja em que este se pode libertar da superfície no decorrer do tempo) ou quando o agente de revestimento impede a adsorção de uma biomolécula (ou outra espécie pretendida) é necessário a troca de agente de revestimento de forma aumentar a biocompatibilidade.³⁸

³⁹ Usualmente, esta funcionalização é efetuada por substituição do agente de revestimento usado na síntese por outra espécie com as características químicas pretendidas.

1.2.4.1 Substituição do agente de revestimento

Os agentes de revestimento utilizados na síntese ou funcionalização de nanopartículas são usualmente moléculas bifuncionais, em que uma das extremidades da molécula tem a função de se ligar à partícula e outra de interagir com outras moléculas ou com o solvente. Alguns desses agentes de revestimento, como péptidos, proteínas ou ácidos nucleicos, podem atribuir propriedades e funcionalidades biológicas às partículas.

Os agentes de revestimento utilizados ao longo deste trabalho para a síntese de AuNPs são o anião citrato e polivinilpirrolidona (PVP), figura 10.

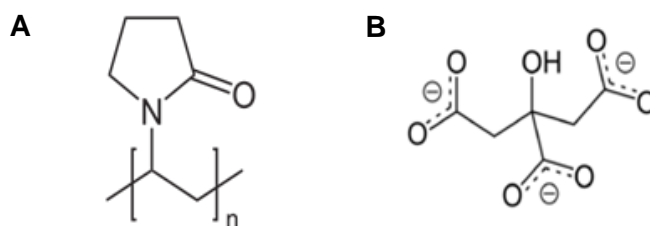


Figura 10. Estruturas moleculares de diferentes agentes de revestimento como polivinilpirrolidona (A) e anião citrato (B).

Para a substituição dos agentes de revestimento usados nas sínteses recorre-se usualmente a alcanotióis. Este tipo de moléculas possuem um grupo tiol (–SH) que tem a capacidade de sofrer quimiossorção forte e estável à superfície do ouro. Alguns dos agentes de revestimento deste tipo mais usados contêm na outra extremidade um grupo carboxílico (–COOH) conferindo às partículas carga negativa uniforme permitindo interações electrostáticas com biomoléculas e assegurando uma elevada estabilidade coloidal em solução aquosa.

Neste trabalho para o processo de funcionalização usou-se ácido 11-mercaptopundecanóico (MUA) e o pentapéptido CALNN constituído por 5 aminoácidos cisteína, alanina, leucina e duas asparaginas (do terminal N para o terminal C) (Figura 11).

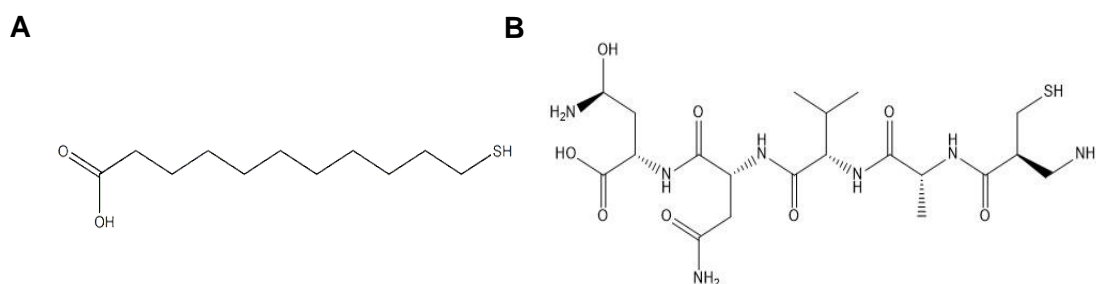


Figura 11. Estruturas moleculares dos agentes de revestimento tiolados ácido mercaptopundecanóico (A) e pentapéptido CALNN (B).

A funcionalização das partículas sintetizadas durante este trabalho realiza-se de forma a aumentar a biodisponibilidade da partícula e para melhorar a interação com outras biomoléculas, nomeadamente com a enzima tirosinase. Os agentes utilizados, MUA e CALNN, ligam-se às partículas fortemente devido à presença do grupo tiol do MUA, do grupo tiol do resíduo de cisteína e possivelmente do grupo amino-terminal no caso do CALNN. Ambos os agentes de revestimento possuem um espaçador lipofílico, constituído pelo grupo $-(CH_2)_{10}-$ no caso do MUA e pelos resíduos alanina e leucina no

caso do CALNN, que permitem um bom compactamento das moléculas do agente de revestimento com a criação de uma camada lipofílica que dificulta a passagem de solvente e de outras moléculas hidrofílicas pequenas. Assim, devem formar uma monocamada estável em torno das partículas (Figura 12.) com grupos carboxílicos superficiais.

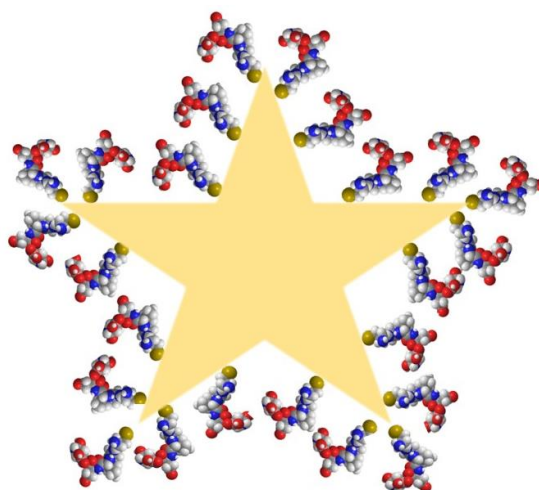


Figura 12. Esquema da ligação do péptido à superfície de uma NP, neste caso as NS (não está a escala).

A eficiência da troca de agente de revestimento foi comprovada usando 3 técnicas: espectroscopia de UV/Vis, medição de potencial zeta e espectroscopia fotoeletrónica de raios-X.

1.2.5 Interação entre partículas-proteínas

O estudo da interação entre proteínas e nanopartículas tem sido um grande desafio, desde garantir uma eficiente troca de agente de revestimento de forma a controlar as interações entre as proteínas e as nanopartículas, até ao estudo do comportamento dos diferentes bionanoconjugados, ou seja das espécies que se formam por adsorção de proteínas à superfície de nanopartículas (figura 13).

A adsorção de proteínas na superfície é um fenómeno complexo mediado por interações por pontes de hidrogénio, de *Van der Waals*, interações electrostáticas, interações hidrofóbicas e por interações de emparelhamento π - π . Quando a proteína é adsorvida à superfície das nanopartículas, dependendo do tipo e força das interações, podem ser formadas dois tipos distintos de camada protéica à superfície da partícula, as denominadas *hard corona* e *soft corona*.⁴⁰ Esta denominação baseia-se na labilidade da adsorção da proteína, em que a *hard corona* é formada pelas proteínas adsorvidas

irreversivelmente às nanopartículas, enquanto que na *soft corona* as proteínas podem permutar com outras espécies em solução.

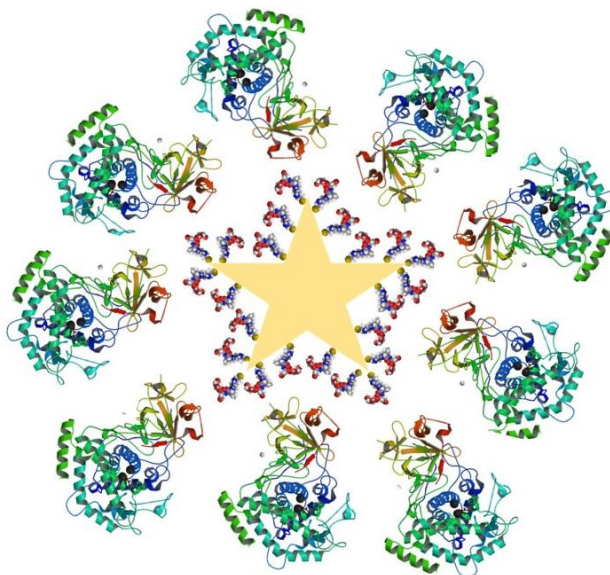


Figura 13. Estrutura do bionanoconjugado em que a proteína encontra-se na *soft corona* (afastado da partícula) enquanto agente de revestimento encontra-se na *hard corona* (próximo da partícula).

A adsorção direta da proteína à superfície da partícula pode alterar a conformação estrutural da proteína, alterando ou perdendo a sua atividade biológica, o que pode resultar em toxicidade ou efeitos opostos aos desejados. Para minimizar essas alterações estruturais recorre-se a utilização de agentes de revestimento pré-adsorvidos à superfície da partícula como os alcanotóis, anteriormente referidos, tornando a superfície mais biocompatível.⁴³ No caso específico de NPs de ouro a presença de aminoácidos cisteína na estrutura da proteína pode levar a ligações fortes entre o grupo tiol deste aminoácido e a superfície de ouro da partícula, caso esta última não esteja eficientemente funcionalizada, o que perturbaria significativamente a estrutura terciária da proteína.

Neste trabalho após a troca de agente de revestimento PVP e citrato por CALNN e MUA formaram-se bionanoconjugados por adição de uma enzima, tirosinase: Supõe-se que esta liga-se às partículas por interações do tipo ponte de hidrogénio com o grupo carboxílico (-COOH) do pentapéptido ou do MUA ou por interações electrostáticas entre as cargas negativas da superfície da partícula e locais carregados positivamente na superfície da proteína.

1.3 Propriedades da Tirosinase

A tirosinase estudada é uma enzima extraída do cogumelo *Agaricus bisporus*, (figura 14), sendo a enzima com elevada importância ao nível científico e alimentar.



Figura 14. Imagem do cogumelo *Agaricus bisporus*.

Esta enzima apresenta um centro ativo binuclear com átomos de cobre que tem a capacidade de catalisar reações que convertem monofenóis (p. ex., L-tirosina) ou difenóis (p. ex., L-DOPA) em orto-quinonas que depois são convertidas em melanina.⁴⁵

Foram descritos quatro genes da tirosinase extraída daquele tipo de cogumelo, em que dois genes (ppo1 e ppo2) codificam duas tirosinases de 64 kDa e os outros dois genes (ppo3 e ppo4) codificam outras duas tirosinases de 66 e 68 kDa.^{41 42} A figura 15 apresenta a estrutura cristalina da cadeia proteica codificada pelo gene ppo3 da tirosinase.⁴³

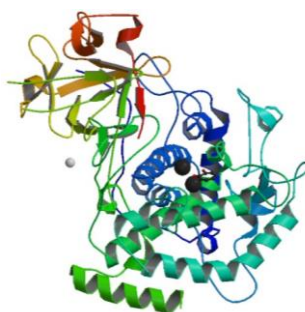


Figura 15. Estrutura da cadeia proteica codificada pelo gene ppo3 da enzima Tirosinase do *Agaricus bisporus* obtida por difração de Raio-X.⁴⁴

A tirosinase apresenta-se como uma proteína com estrutura quaternária com um peso molecular de 110 kDa sendo que é constituída por duas subunidades.⁴⁵ A subunidade H tem um peso molecular de 43 kDa (apenas esta subunidade apresenta atividade enzimática) enquanto a subunidade L de 14 kDa não apresenta qualquer função catalítica direta (figura 16).^{46 47}

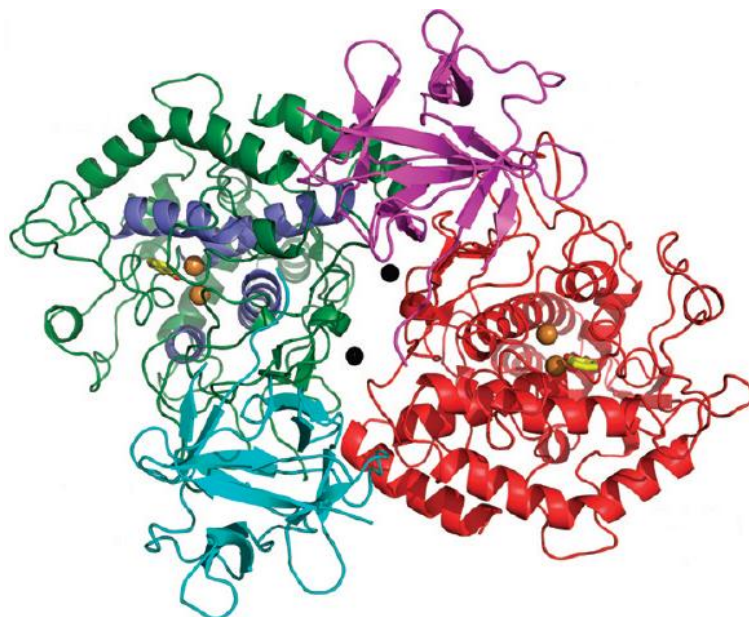
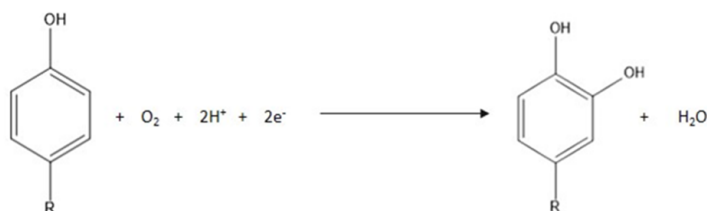


Figura 16. Estrutura tridimensional da tirosinase de *Agaricus bisporus* e as suas subunidades **H1** (verde), **H2** (vermelho), **L1** (azul) e **L2** (rosa) obtida por difração de raio-X.⁴⁹

A tirosinase apresenta uma atividade enzimática que permite a oxidação de compostos fenólicos para a produção de orto-quinonas. Esta produção pode realizar-se por duas vias reacionais utilizando monofenóis ou difenóis, figura 17.^{50 51}

Reação com monofenóis



Reação com difenóis

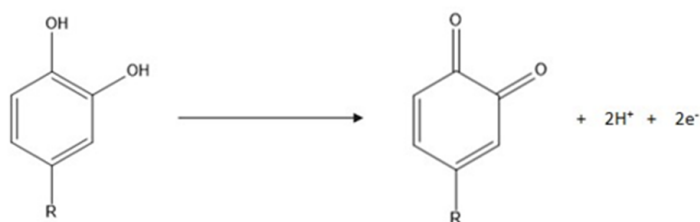


Figura 17. Esquema das reações da atividade enzimática da tirosinase usando monofenóis e difenóis.⁵²

Capítulo 2 - Técnicas de Caracterização

2.1 Espectroscopia de UV-Visível

A espectroscopia de UV/Visível é uma das técnicas espectroscópicas mais comuns e baseia-se na medição da intensidade de luz ultravioleta ou visível absorvida por uma amostra a um determinado comprimento de onda, comparativamente a um branco. Além de informação relativa aos comprimentos de onda correspondentes aos máximos de absorção, que podem ser utilizados para fins identificativos, embora com baixa qualidade, a absorvância é frequentemente utilizada para determinar a concentração de espécies em solução, através da equação de *Lambert-Beer* (equação 1).

$$A = \epsilon \cdot c \cdot l$$
[Equação 1]

Em que A é a absorvância a um determinado comprimento de onda, c é a concentração molar da espécie absorvente, ϵ representa o coeficiente de extinção molar e l o passo ótico da célula que contém a amostra.⁵³

No decorrer deste trabalho esta técnica foi fundamental para monitorizar o processo de síntese dos diversos tipos de nanopartículas utilizados neste trabalho, visto estas possuírem propriedades óticas fortemente dependentes da sua forma e tamanho. Foi também crítica na determinação da concentração e tamanho de partículas esféricas (utilizadas como ponto de partida para nanopartículas de outras formas) utilizando para esse fim o método de cálculo proposto por Haiss et al.⁵⁴

2.2 Microscopia de Transmissão Eletrónica

A microscopia de transmissão electrónica (TEM) é uma técnica de microscopia de alta resolução espacial, que permite a observação de micro e nanoestruturas para caracterizar nanomateriais, permitindo determinar seu tamanho e forma.

Os microscópios de TEM funcionam de forma conceptualmente semelhante aos microscópios óticos diferindo no tipo feixe. Os microscópios óticos usam um feixe de luz visível enquanto os de transmissão electrónica usam um feixe de eletrões. A utilização desses feixes permite aumentar a resolução devido ao reduzido comprimento de onda de Broglie dos eletrões usados, permitindo assim ampliações até um milhão de vezes. As ampliações até esta gama permitem a observação estrutural detalhada das

amostras, como a morfologia estrutural dos nanomateriais assim como em certos casos os seus planos atômicos individuais.⁵⁵

No microscópio de transmissão eletrónica o feixe eletrónico é produzido em filamentos de hexaborato de lantânio (LaB_6) ou Tungsténio (W), usados como cátodos. Para que este feixe seja transmitido o interior do microscópico deve encontrar-se sob vácuo, uma vez que o ar impediria a transmissão do feixe de eletrões. Os eletrões são focados através de uma série de lentes (essencialmente bobines que focam o feixe com campos magnéticos) e são transmitidos através da amostra, sendo o feixe transmitido focado numa câmara de CCD para formar a imagem.⁵⁵

A imagem de TEM resulta da interação entre os eletrões com a amostra, devendo-se o contraste de imagem tanto à densidade eletrónica da material a analisar, como à orientação espacial da matriz cristalina relativamente ao feixe.⁵³ Para caraterizar morfologicamente e estruturalmente estes materiais é necessário que estes contenham elevada densidade eletrónica de maneira a que a imagem apresente uma zona escura (partículas) sendo assim possível uma observação nítida das imagens estruturais e morfológicas dos nanomateriais. Neste projeto recorreu-se a esta técnica para caracterizar morfologicamente as nanopartículas sintetizadas de forma a determinar o tipo morfologia e estrutura, sendo essencial para o processo de otimização das sínteses. As imagens obtidas a partir desta técnica foram analisadas recorrendo a um *software* adequado permitindo determinar o tamanho médio das partículas.⁵⁵

As técnicas de microscopia também apresentam algumas desvantagens como o facto de serem técnicas de análise local, havendo a necessidade de analisar várias zonas da grelha onde a amostra é depositada, de maneira a obter imagens representativas da amostra. O elevado custo dos instrumentos e sua manutenção constitui também uma desvantagem para a utilização mais abrangente desta técnica.

O TEM neste trabalho foi utilizado para verificar se as partículas adquiriram a forma desejada (esferas, estrelas, cubos e triângulos) assim como para determinar o diâmetro médio das mesmas através da análise das imagens obtidas, utilizando para esse fim o *software ImageJ*.

2.3 Dispersão de luz dinâmica (DLS)

A técnica de dispersão de luz dinâmica (DLS), também denominada espectroscopia de correlação fotónica ou dispersão de luz quasi-elástica, permite determinar os coeficientes de difusão e a sua distribuição para soluções coloidais de

partículas com diâmetros da ordem dos nanómetros. O coeficiente de difusão permite calcular o raio hidrodinâmico, em determinadas condições.⁵⁶

Esta técnica baseia-se na dispersão de luz que ocorre quando um feixe de luz incide sobre uma partícula com dimensões da ordem de grandeza ou menores do que o comprimento de onda do feixe de luz. Utilizando um laser como fonte de luz monocromática e coerente, é possível detetar flutuações na intensidade de luz dispersa devido ao movimento Browniano das partículas. Este, por sua vez, depende da dimensão das partículas, sendo que as partículas com menores dimensões têm maior mobilidade. O coeficiente de difusão das partículas analisadas pode ser obtido pela análise das flutuações, o que permite calcular o raio hidrodinâmico recorrendo à equação de Stokes-Einstein (equação 2).⁵⁸

$$D = \frac{RT}{N_A} \frac{1}{6\pi\eta a} \quad [\text{Equação 2}]$$

em que D é o coeficiente de difusão, R é a constante dos gases perfeitos, T a temperatura absoluta, N_A a constante de Avogadro, η é a viscosidade do meio e a é o raio hidrodinâmico da partícula. O raio hidrodinâmico assim calculado é normalmente superior ao raio das partículas obtidos por outras técnicas (tais como microscopia eletrónica de transmissão, microscopia eletrónica de varrimento e difração de raios X) devendo-se isto à esfera de solvatação que se encontra a superfície das partículas. Esta esfera de solvatação forma-se devido à presença de iões em solução que interagem electrostaticamente com a partícula, formando uma camada em volta da partícula que aumenta efetivamente o seu raio.⁵⁷

Esta técnica permite assim determinar o tamanho das partículas em suspensão de uma forma rápida e fiável em amostras com baixa dispersão de tamanhos. Para amostras polidispersas, a medição não é tão fiável e ocorre usualmente um desvio dos resultados para maiores diâmetros. Tal deve-se ao facto de a intensidade da luz dispersa por uma partícula aumentar numa potência de 6 em relação ao raio. Assim, a contribuição das partículas maiores para a intensidade de luz medida é muito superior para as partículas com maior tamanho, podendo assim mascarar as flutuações de intensidade de luz devido às partículas mais pequenas. Assim, a técnica é consideravelmente sensível à formação de agregados, sobrestimando à presença destes últimos assim como de NPs de maiores tamanhos na distribuição de raio hidrodinâmico determinado. Por esta razão a medição fiável de diâmetros através desta técnica depende consideravelmente da estabilidade das soluções coloidais.^{56 57} Durante

este trabalho utilizou-se esta técnica para determinar o diâmetro hidrodinâmico médio das NPs sintetizadas assim como o seu grau de agregação.

2.4 Potencial zeta

O potencial zeta (ζ) é o potencial electrostático devido à adsorção do agente de revestimento e outros iões à superfície das partículas. O potencial zeta é frequentemente considerado uma medida de estabilidade de sistemas coloidais, dado que em muitos casos esta depende em grande parte das repulsões electrostáticas existentes entre as partículas.⁵⁸

As nanopartículas (material e agente de revestimento) apresentam uma superfície que está organizada numa dupla camada elétrica, região interna ou camada de Stern onde se encontram os iões fortemente ligados à superfície e uma região externa ou camada difusa em que se encontram iões ligados à superfície por interações mais fracas (figura 18).⁵⁸

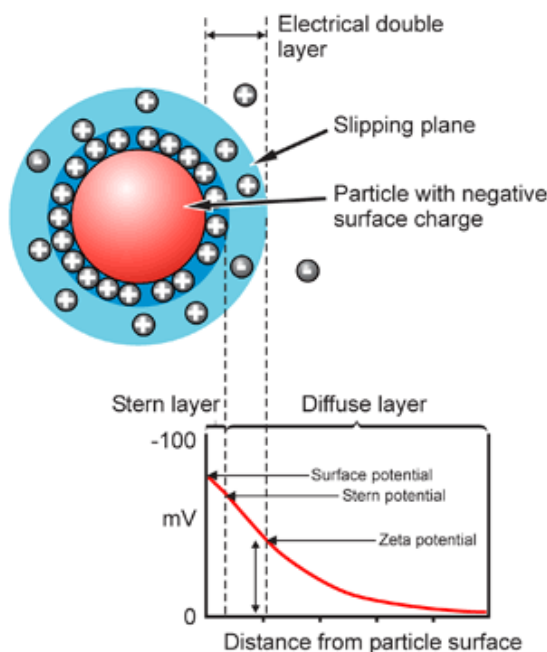


Figura 18. Esquema que descreve a camada de Stern que representa a relação dos diferentes potenciais em torno da partícula.⁵⁹

A camada difusa apresenta uma fronteira em que os iões e as nanopartículas formam uma entidade estável que se designa como plano deslizante e o potencial desta fronteira denomina-se potencial zeta.

A técnica utilizada para a medição de potencial zeta neste trabalho baseia-se na aplicação de um campo elétrico à amostra de modo induzir movimentação das nanopartículas carregadas em direção aos elétrodos com carga oposta. A velocidade

do movimento da partícula no campo elétrico é medida por DLS e corresponde à mobilidade electroforética que se pode relacionar com o potencial ζ através da equação de Henry (Equação 3).⁵⁸

$$U_E = \frac{2\varepsilon\zeta}{3\eta} kR \quad [\text{Equação 3}]$$

em que U_E representa a mobilidade eletroforética, ε a constante dielétrica do meio, η a viscosidade do meio, ζ o potencial zeta e $f(kR)$ é a função de Henry. Esta técnica apresenta algumas limitações devido as aproximações efetuadas para a função de Henry em que se utiliza aproximações Smoluchowski ($f(kR) = 1,5$) para sistemas aquosos e para sistemas não aquosos recorre-se à aproximação de Huckel ($f(kR)=1$), ocorrendo situações em que estas aproximações não são aplicáveis.⁵⁸

O potencial zeta tem uma elevada importância no decorrer deste trabalho permitindo verificar a estabilidade coloidal das partículas sintetizadas e devido às diferenças de carga superficial dos agentes de revestimentos utilizados, permite ser usada para monitorar o processo de troca de agente de revestimento/ funcionalização. Esta técnica foi também essencial para a análise da formação de bioananoconjugados, permitindo seguir a adsorção de proteínas na superfície das NPs através das mudanças no potencial zeta medido.

2.5 Espectroscopia fotoeletrónica de raios X (XPS)

A espectroscopia fotoelectrónica de raios-X (XPS), também denominada de Espectroscopia Eletrónica de Análise Química (ESCA) é uma técnica muito utilizada para a determinação da composição química da superfície dos materiais. A técnica de XPS inicialmente excita uma pequena área da amostra a analisar com um feixe de raio-X. A energia dos eletrões excitados – fotoeletrões – é determinada por um *Concentric Hemispherical Analyser* (CHA) e este detetor cria um espectro com os picos de energia dos fotoeletrões, figura 19.⁶⁰

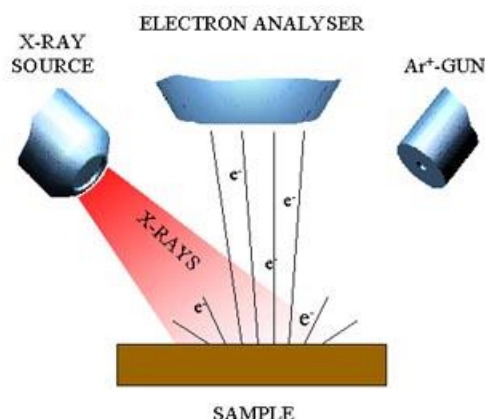


Figura 19. Esquema representativo da deteção dos eletrões após a emissão de um feixe de raio-X.⁶¹

A energia de ligação necessária para libertar cada eletrão da amostra pode ser determinada em cada pico do espectro e esta energia é característica para cada elemento. Contudo, a energia de ligação e a forma do pico podem ser alteradas pelo estado químico do átomo de onde o eletrão foi emitido permitindo assim esta técnica a obtenção do estado de oxidação dos elementos analisados. Pode também desta forma, fornecer informação acerca dos tipos de ligação química presentes na amostra.^{61, 62} No entanto, dependendo dos elementos a analisar, esta técnica pode não apresentar uma elevada discriminação entre o tipo de ligações químicas, devido à sobreposição de diferentes sinais. Outra desvantagem desta técnica é o facto de ser destrutiva para a amostra devido a alta energia da radiação utilizada.⁶¹

A técnica de XPS neste trabalho foi usada para detetar a presença dos agentes de revestimento CALNN, na superfície das NPs permitindo confirmar se o processo de funcionalização ocorreu com sucesso.

2.6 Nanoparticle Tracking Analysis (NTA)

A "Nanoparticle Tracking Analysis" (NTA) é uma técnica que permite análise de soluções coloidais que apresentem partículas entre 10 - 2000 nm podendo determinar-se a concentração das partículas e o seu tamanho médio. A técnica baseia-se na deteção do movimento Browniano das partículas na amostra, usando para tal um microscópio ótico e um laser como fonte de iluminação, permitindo detetar cada partícula individual pela sua luz dispersa. A luz dispersa pelas partículas é registada usando uma câmara digital e o movimento de cada partícula pelo tubo é depois analisado com auxílio de um *software* desenvolvido para este tipo de análise (figura 20). Em condições adequadas, esta técnica permite determinar o número de partículas

existentes no volume de amostra analisado e, dado que esse volume é conhecido, permite determinar a concentração das partículas numa solução.⁶²

Adicionalmente, esta técnica permite registar o percurso de partículas individuais e, a partir da distância percorrida num determinado intervalo de tempo é possível calcular o coeficiente de difusão de partículas individuais. Tal como no DLS, o coeficiente de difusão está relacionado com o raio hidrodinâmico que pode então ser calculado a partir da equação de Stokes-Einstein (equação 1). A determinação é feita em tempo real, permitindo caracterizar instantaneamente a qualidade da amostra, como por exemplo o nível de agregação e dissolução da amostra. O tempo de análise normal é cerca de 30 segundos. A precisão da determinação aumenta com o tempo de análise, dado que é detetado e analisado um maior número de partículas.⁶²

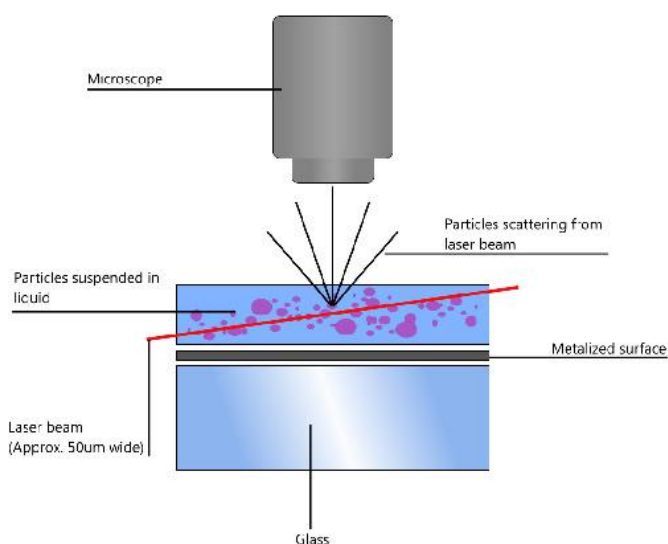


Figura 20. Representação do funcionamento do aparelho de NTA.⁶³

Esta técnica apresenta a mesma desvantagem ao nível da determinação do tamanho da NP que a técnica descrita anteriormente, DLS. A NTA permite-nos obter o tamanho das partículas a partir do movimento Browniano. Esse valor normalmente é superior ao obtido por outras técnicas, tais como o TEM e SEM, devido à esfera de solvatação e à dificuldade de diferenciar partículas individuais de aglomerados.^{64 65}

Neste trabalho esta técnica foi essencialmente utilizada para determinação da concentração das nanoestrelas em solução. Os diâmetros hidrodinâmicos médios das NSs obtidos por esta técnica posteriormente foram comparados com os diâmetros obtidos a partir das imagens de TEM.

Capítulo 3- Procedimento experimental

3.1 Materiais e reagentes

Todos os materiais de vidro foram lavados previamente com água-régia (mistura 3:1 de ácido clorídrico a 37% e ácido nítrico concentrado) posteriormente passado por água (água ultra pura, $18,2 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}^{-1}$) e depois foram secos para que não houvesse alteração das concentrações das soluções. Todas as soluções foram preparadas com água ultra pura.

Na síntese das nanopartículas de 15 nm usou-se uma solução de ácido tetracloroáurico (III), HAuCl_4 , em HCl a 30% (p/p, 99,99% grau de pureza da Sigma-Aldrich) e citrato de sódio, $\text{HOC}(\text{COONa})(\text{CH}_2\text{COONa})_2$ (99% grau de pureza da Sigma Aldrich).

Na síntese das nanoestrelas, em ambos os métodos, utilizaram-se os seguintes reagentes: N,N-dimetilformamida, DMF, (99,8 % grau de pureza da Sigma-Aldrich), polivinilpirrolidona (MM 10 000 da Sigma Aldrich), uma solução do ácido tetracloroáurico (III), HAuCl_4 , 50 mM, preparada a partir de uma solução de HAuCl_4 a 30% (p/p, 99,99% grau de pureza da Sigma-Aldrich) e para o processo de lavagem das NPs, etanol absoluto (99,9 % grau de pureza das Sigma Aldrich) para a outra síntese utilizou-se a mesma solução de HAuCl_4 (síntese anterior), nitrato de prata, AgNO_3 , (99,0% grau de pureza da Sigma Aldrich) e ácido ascórbico, AA (99,0% grau de pureza da Sigma Aldrich).

Para o processo de funcionalização das NSs prepararam-se soluções de ácido 11-mercaptoundecanóico (MUA), $\text{HS}(\text{CH}_2)_{10}\text{COOH}$ (Sigma-Aldrich, 95%), pentapéptido CALNN (99% de grau de pureza CALSO). Para preparar os tampões usou-se ácido fosfórico, H_3PO_4 , (85% em H_2O da Sigma Aldrich), di-hidrogenofosfato de potássio, KH_2PO_4 (98% de grau de pureza da Sigma Aldrich) e hidrogenofosfato de potássio, K_2HPO_4 , (98% de grau de pureza da Sigma Aldrich). As soluções de HCl 1M e NaOH 1M já se encontravam preparadas.

Para a formação do bionanoconjugados usou-se tirosinase em pó (1000 unidades/mg da Sigma Aldrich). Para determinar a sua concentração recorreu-se ao método BCA utilizando como proteína padrão albumina do soro bovino (BSA) (Sigma-Aldrich) e o ácido bicinconínico (Sigma-Aldrich) e uma solução de sulfato de cobre (4% (w/v) Sigma-Aldrich).

3.2 Síntese das nanopartículas

3.2.1 Síntese de nanopartículas esféricas de 15 nm, *AuNPs*

Sintetizaram-se nanopartículas esféricas de cerca de 15 nm pelo método de Turkevich,³⁴ com ligeiras modificações. Num balão de 3 tubuladuras adicionou-se 62,5 ml de água e 43,5 μ L de uma solução de HAuCl_4 1,445 M, 30% de HCl. Colocou-se o balão num sistema de refluxo num banho de parafina em agitação (130°C, 450 rpm), deixando a solução em ebulição durante 2 minutos. Adicionou-se rapidamente uma solução de citrato de sódio (0,0714 g de citrato de sódio di-hidratado, 0,03 mmol) em 6,5 mL de água. A solução mudou imediatamente de cor para preto e depois gradualmente para vermelho intenso. Deixou-se a reagir durante 15 minutos sob agitação, em refluxo e finalmente deixou-se arrefecer à temperatura ambiente.

Para trocar o agente de revestimento usado na síntese (ânion citrato) por PVP recorreu-se ao método de Liz Marzán.⁶⁶ Considerando que a quantidade necessária de PVP para a troca completa do citrato por polímero corresponde a aproximadamente 60 moléculas de PVP por nm^2 de área superficial. Estimou-se a área superficial total das nanopartículas de ouro na solução coloidal a partir do diâmetro médio das nanopartículas e da sua concentração na solução. Esta estimativa foi feita por espectroscopia de UV/Vis utilizando um método publicado.⁶⁷ Dissolveu-se a quantidade de PVP estimada anteriormente em 5 mL de água Mili-Q. Adicionou-se à solução coloidal de nanopartículas de ouro gota a gota, mantendo a solução em agitação vigorosa (750 rpm) e deixou-se reagir durante a noite com agitação moderada (350 rpm) para favorecer a troca de agente de revestimento. Por fim centrifugou-se a solução coloidal a 10 000 rpm (10397 g) durante 10 minutos ou durante o tempo necessário para que o sobrenadante não apresente uma coloração vermelha, indicativa da presença de nanopartículas em suspensão. Ressuspendeu-se o resíduo em etanol absoluto filtrado utilizando filtros (0,45 μ m) numa seringa de 5 mL.

3.2.2 Síntese de nanoestrelas de ouro, *AuNS@PVP* e *AuNS@Citrato*

Para sintetizar as nanoestrelas de ouro utilizaram-se dois tipos de síntese. Inicialmente era usado um método descrito no ponto 3.2.2.1 no qual eram usados como reagentes DMF e PVP, funcionando este último como agente de revestimento responsável pela estabilização e também catalisando a redução do ouro com vista a formação de nanopartículas com forma de estrela. Ao longo do trabalho ocorreu uma alteração da composição do reagente PVP, importante no processo de redução do Au(III) à Au , deixando de desempenhar essa função devido à possível alteração do

processo de fabrico deste composto ou a alguma possível contaminação que ocorre durante o processo. Para a continuação destes estudos recorreu-se a uma pesquisa para encontrar um novo método de síntese de nanoestrelas de ouro, no qual foi testado e reproduzido com sucesso, descrito no ponto 3.2.2.2.

3.2.2.1 Nanoestrelas de ouro resvestidas com PVP, AuNS@PVP

Dissolveu-se 3 gramas de PVP (0,3 mmol) em 30 mL de dimetilformamida (DMF) num banho de ultrassons, para acelerar o processo de dissolução do polímero no solvente orgânico. Após dissolução completa, colocou-se a solução num banho a 25 °C com agitação (350 rpm) e adicionou-se 164 µL de solução de HAuCl₄ 50 mM (a partir de uma solução aquosa HAuCl₄, 1,445 M, 30% HCl). Deixou-se em agitação durante 2 minutos e adicionou-se um volume de NPs de 15 nm (revestidas com PVP). Este volume foi variado entre 100 – 600 µL conforme a razão pretendida entre a concentração das NPs de 15 nm e o ouro que já se encontra em solução, de modo a obter NSs com diferentes características morfológicas.^{34 35 36}

Tapou-se com *parafilm* e deixou-se em agitação durante 2 horas e posteriormente em repouso durante 12 horas. Centrifugaram-se as nanopartículas a 10 000 rpm (19397 g) durante 20 minutos, lavaram-se 4 vezes por centrifugação e ressuspendeu-se em etanol absoluto filtrado com uma seringa de 5 mL usando filtros de 0,45 µm. Finalmente centrifugaram-se nas mesmas condições e ressuspenderam-se em água.

3.2.2.2 Nanoestrelas de ouro revestidas com citrato, AuNS@Citrato

Num matraz preparou-se 30 mL de uma solução aquosa 0,25 mM de HAuCl₄ (a partir de uma solução aquosa de HAuCl₄, 1,445 M, 30% HCl) e adicionou-se 30 µL de HCl 1M (pode ou não ser adicionado mas favorece a formação das pontas). Colocou-se em agitação vigorosa (1100 rpm). Posteriormente adicionou-se as AuNPs de 15 nm, revestidas com citrato, rapidamente e em simultâneo adiciona-se 150 µL de uma solução AgNO₃ 2 µM (a partir da diluição de uma solução de AgNO₃ 20 µM) e 300 µL de uma solução de ácido ascórbico 100 mM, sempre em agitação vigorosa, tornando-se a solução instantaneamente azul.³⁷

O volume de NPs de 15 nm que se adicionou foi 374 µL. Este valor foi calculado a partir da relação entre a absorvância (literatura: Abs_{pico} = 2,2854) com a absorvância do pico das NPs de 15 nm sintetizadas.³⁷

Deixou-se a solução a reagir durante 30 segundos e adicionou-se um volume de NaOH 1 M de forma à ajustar o pH entre 7 e 9. Lavou-se por centrifugação a uma velocidade de 4500 rpm (500 g) durante 10 minutos, removeu-se o sobrenadante cuidadosamente e ressuspendeu-se em água. Verificou-se que nas lavagens por centrifugação se perdiam muitas partículas por ficarem agarradas à superfície dos tubos pelo que se recorreu à funcionalização imediatamente após síntese (3.3.2).³⁷

3.3 Funcionalização das nanopartículas de ouro usando o pentapéptido CALNN e MUA

Para a remoção do agente revestimento PVP da superfície das partículas utilizaram-se vários métodos. A remoção deste agente de revestimento por CALNN e MUA foi efetuada para aumentar a biodisponibilidade das partículas. O PVP é um polímero de cadeia longa, dificultando a sua remoção e substituição, por isso tentaram-se vários métodos.

De maneira a estabelecer a quantidade de ligando a ser adicionada às NPs para uma funcionalização eficiente foi efetuado um cálculo aproximado da quantidade necessária para um total revestimento das NSs. Para este cálculo, primeiramente usaram-se os valores de diâmetro médio determinados por TEM (secção 4.2) para calcular a área superficial da NP, assumindo que esta teria uma morfologia esférica. Este cálculo constitui uma aproximação grosseira, dado que não contabiliza o aumento de área superficial devido à forma das nanoestrelas, mas permite obter uma ordem de grandeza sobre a área disponível para ligação. Seguidamente, calculou-se o número de moléculas de agente de revestimento que poderão geometricamente ocupar essa área superficial com base na área superficial ocupada por uma molécula de MUA, determinada na literatura de 5,7 nm².⁶⁷ Este valor será em princípio inferior à área ocupada pelas moléculas de CALNN que não devem formar uma monocamada tão compacta como um alcanotiol, pelo que o erro nesta estimativa deve ser por excesso. Por fim, calculou-se a quantidade de agente de revestimento necessária para obter uma monocamada completa na superfície de todas as NSs existentes num determinado volume de solução, usando a concentração de NPs obtida por NTA. Este valor foi utilizado como referência e experimentalmente foram usados sempre múltiplos deste valor de maneira a favorecer a troca de ligandos.

3.3.1 Funcionalização das nanoestrelas, **AuNS@PVP**, com pentapéptido **CALNN**

Para o processo de funcionalização testaram-se excessos molares de CALNN para NS de 2 a 5 vezes mais do que a concentração de saturação. Utilizou-se a concentração das AuNS@PVP obtida pela técnica NTA. A partir desta concentração de NS determinou-se a quantidade de CALNN (excesso molar de 2x e 5x) necessários para funcionalizar 30 mL de solução coloidal de NS.

Adicionou-se o volume de CALNN entre os 228,8 - 572,0 μL de uma solução de solução *stock* (4,7 mM) à solução coloidal das partículas e deixou-se no banho de ultrassons durante 1 hora. Manteve-se a solução em repouso a 4°C. Ao fim de 2, 5 e 7 dias de incubação retiraram-se amostras de 900 μL e adicionou-se 100 μL de cada uma das soluções tampão entre pH 3 e 7 (tampão fosfato 1 M, preparado a partir de soluções de H_3PO_3 1M, KH_2PO_4 1M e K_2HPO_4 1 M). Mediu-se o pH final de cada amostra e analisaram-se por espectroscopia de UV-Vis e medição de potencial zeta. Posteriormente preparou-se uma amostra para análise de XPS tal como descrito na secção 3.5.5.

3.3.2 Funcionalização das AuNS@PVP com o ácido 11-mercaptoundecóico (MUA) por incubação a temperatura elevada

Neste método, inicialmente testou-se a estabilidade das AuNS@PVP a temperaturas elevadas, colocando-as num banho a 40°C durante 12 horas. Compararam-se os espectros das NSs antes e depois do aquecimento.

Utilizou-se um excesso molar de MUA de 5 até 50, calculado de forma idêntica ao método anterior.

Após a adição de um volume (entre 50 - 200 μL consoante o excesso molar pretendido) de solução de MUA 10 mM em etanol ao colóide de NSs. Colocou-se a solução coloidal com MUA num banho de ultrassons durante uma hora e posteriormente é deixada à borbulhar em argon durante 30 minutos. Utiliza-se atmosfera inerte para evitar a oxidação do grupo tiol presente na molécula de MUA.

O frasco foi convenientemente selado e deixou-se num banho quente à 40°C durante à noite.

Posteriormente analisou-se as soluções por espectroscopia de UV/Vis, mediu-se o pH e seguidamente realizaram-se as medições de potencial zeta. Estas medições foram realizadas sempre a pH=7 e cada amostra foi medida 3 vezes. As medições de potencial zeta foram consideradas validas quando para cada medição, estas

apresentam aproximadamente a mesma distribuição de potencial. Essa sobreposição indica que no decorrer das medições não houve alterações da amostra devido ao aquecimento dos elétrodos. Isto é válido para todas as medições que se realizam neste método e subsequentes.

3.3.3 Funcionalização das AuNS@PVP com o ácido 11-mercaptoundecenoico (MUA) por imobilização das partículas em vidro.

Num matraz adicionou-se 10 mL de solução de NSs, previamente lavada, adicionou-se 100 μ L de solução de ácido fosfórico 1M. Deixou-se em repouso durante 6 – 12 horas de forma a promover a adsorção das partículas ao vidro, este processo foi acompanhado por análise UV/Vis periódica (1h30).

Quando se verificou por análise de UV/Vis a perda total das bandas da solução coloidal. Removeu-se o sobrenadante, lavou-se o vidro suavemente com água (de forma a que não haja dessorção das partículas por força mecânica) e removeu-se a água utilizada na lavagem. Posteriormente adicionou-se 5 mL de uma solução aquosa 0,5 mM MUA, solução diluída a partir de uma solução alcoólica de MUA de 10 mM.

Deixou-se a solução em repouso num banho à 40°C após a adição de 100 μ L de uma solução de NaOH 1M de forma a desencadear o processo de dessorção das partículas no vidro acompanhando por espectroscopia de UV/Vis.

O sobrenadante contendo as partículas que se desorveram do vidro foram centrifugadas a uma rotação 4000 rpm (1646 g) por 15 minutos e ressuspendeu-se em água. Depois retirou-se 900 μ L de uma amostra, adicionou-se 100 μ L de tampão de fosfato pH=7 e mediu-se o potencial zeta.

3.3.4 Funcionalização da nanoestrelas de ouro (AuNS@Citrato) com MUA.

Após a síntese desta NPs, adicionou-se entre 30 – 60 μ L de uma solução de NaOH 1M de forma a aumentar o pH da solução de NSs para valores entre 7-9. A esta solução adicionou-se razões molares de NSs e MUA (1x, 10x, 100x) neste caso volume de 14,32 μ L, 143,2 μ L e 1432 μ L de uma solução aquosa de MUA 0,5 mM (diluída a partir de uma solução alcoólica de MUA de 10 mM) e observou-se a estabilidade das NSs com MUA por UV/Vis. Os volumes de MUA foram obtidos a partir do valor de capping por nm^2 (5.7) convertido para moles de capping por nm^2 . Retirou-se uma amostra de 900 μ L cada uma das soluções de NSs funcionalizadas com MUA e adicionou-se 100 μ L de tampão fosfato pH=7 e mediu-se o potencial zeta.

Comprovou-se a funcionalização por variação do potencial zeta e pelo método de agregação das partículas com adição de sal inorgânico KNO_3 em relação as NSs revestidas com citrato. Os volumes e as concentrações de sal encontram descritos na tabela 1.

Tabela 1. Tabela das soluções coloidais contendo diferentes concentração do sal inorgânico, KNO_3 .

Solução	1	2	3	4	5	6	7	8	9
C (KNO_3) mM	800	600	400	200	100	80	60	40	10
V (NSs) μL	200	200	200	200	200	200	200	200	200
V (KNO_3) μL	800	600	400	200	100	80	60	40	10
V (H_2O) μL	0	200	400	600	700	720	740	760	790
V (total) μL	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000

3.4 Bionanoconjugados (BNC) construído NS com a proteína tirosinase

Os bionanoconjugados foram construídos com os dois tipos de nanoestrelas sintetizadas sendo inicialmente calculado a concentração de tirosinase através do método BSA.

3.4.1. Determinação da concentração da proteína tirosinase

Para determinar a concentração da tirosinase, utilizou-se uma outra proteína BSA (albumina de soro bovino) que já se encontrava quantificada para a construção da regressão linear. Preparou-se 6 amostra diluída da proteína BSA em que se adicionou-se 2 ml de uma solução 3:50 de sulfato de cobre e ácido bicinconínico. Depois preparou-se mais 2 amostras em que uma continha apenas água com solução cobre e o ácido (ensaio branco) e outra continha a tirosinase com a solução cobre e ácido. Deixou-se a reagir de forma a favorecer a formação do complexo proteico ocorrendo uma alteração da coloração das amostras, passando de verde para um roxo e mediu-se a absorvância, tabela 2.

Tabela 2. Valores da absorvância das várias soluções de BSA, da tirosinase e o ensaio em branco.

Concentração BSA ($\mu\text{g/mL}$)	1º Leitura	2º Leitura	Média	Média tendo em consideração o branco
Branco	0.1952	0.1898	0.1925	
1000	1.2797	1.3274	1.30355	1.11105
500	0.8001	0.7626	0.78135	0.58885
250	0.5081	0.4838	0.49595	0.30345
125	0.339	0.3284	0.3337	0.1412
62.5	0.2572	0.2553	0.25625	0.06375
31.25	0.2223	0.207	0.21465	0.02215
Tirosinase	1.1205	1.1189	1.1197	0.9272

A partir dos valores descritos na tabela anterior construi-se a regressão linear relacionado a concentração BSA e respectivas absorvância, figura 21, de forma a determinar a concentração de tirosinase do lote.

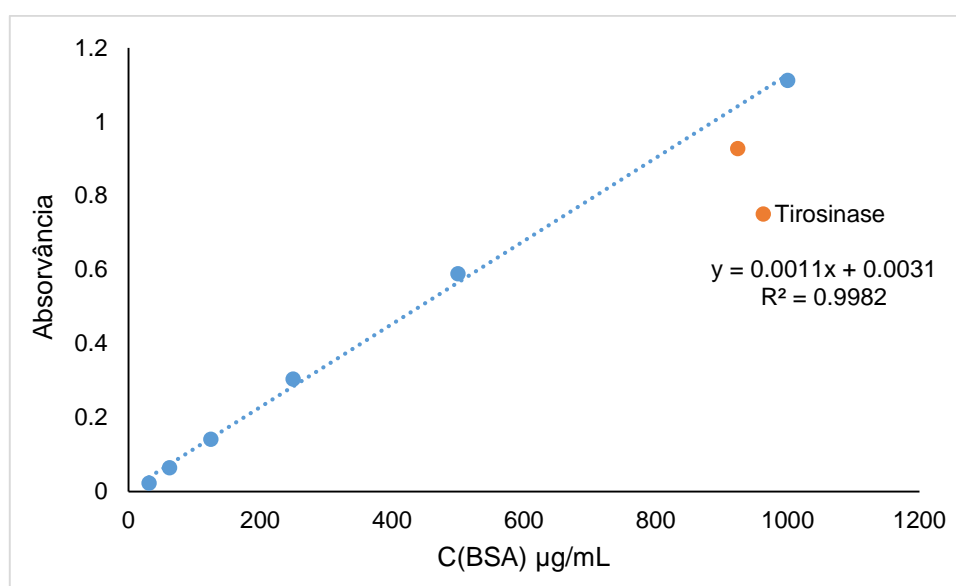


Figura 21. Regressão linear obtida a partir da concentração e absorvância das soluções proteicas de BSA

A partir do declive da regressão linear, que foi aceite pois apresenta um R (erro) próximo de 1 (0.998), determinou-se a equação do declive ($y = 0.0011x + 0.0031$) em que y representam a absorvância e x a concentração. Substitui-se a absorvância determinada a partir solução proteica contendo tirosinase de forma obter a sua concentração, $924.1 \mu\text{g/mL}^{-1}$.

A concentração de tirosinase obtida foi convertida para concentração molar tendo em conta a massa desta proteína 110 kDa ($110000 \text{ g mol}^{-1}$). sendo o valor convertido foi $8.4 \times 10^{-6} \text{ M}$.

3.4.2 Bionanoconjugado, estrutura das AuNS@PVP e AuNS@Citrato revestido com tirosinase.

Após processo de funcionalização com MUA, seguiu-se a construção dos bionanoconjugados utilizando a proteína tirosinase. Para verificar a formação destas estruturas recorreu-se a técnica potencial zeta.

Para construção dos BNC foi necessário determinar a quantidade de proteína que se adiciona para cada lote de solução de NS. Essa quantidade foi determinada a partir da concentração das nanoestrelas obtida por NTA. O volume de tirosinase foi ajustado tendo em conta as razões molares de proteína para NP de 50 e 200. Preparou-se amostras de volume total de 900 μL contendo 300 μL de solução de NSs com PVP e MUA, adicionou-se volumes de 141,92 μL e 567,65 μL de Tirosinase para as razões molares 50 e 200 respetivamente de uma solução *stock* de 2,04 μM e adicionou-se água para completar o volume. A cada uma das amostras de razão molar 50 e 200 adicionou-se 100 μL de um tampão fosfato de pH=7 de 10 mM. Deixou-se em *overnight* à 4°C de forma a favorecer a adsorção da proteína.

Para as estrelas sintetizadas pelo método de Vo Dinh foram mantidos os rácios molares de 50 e 200 tendo de se calcular novos volumes de tirosinase a adicionar tendo em conta a nova concentração destas partículas. Sendo assim preparou-se amostras de volume total de 900 μL contendo 300 μL de solução de NSs com MUA, adicionou-se volumes de 89,45 μL e 357,8 μL de Tirosinase (respetivamente para rácios molares de 50 e 200) de uma solução *stock* de 8,04 μM e adicionou-se água de forma a completar o volume total. A cada uma das amostras adicionou-se 100 μL de um tampão fosfato de pH=7 de 10 mM. Deixou-se em *overnight* à 4°C de forma a favorecer a adsorção da proteína.

Todas as amostras de BNCs apresentando razão molar 50 e 200 a partir das diferentes nanoestrelas após o processo de incubação adicionou-se 100 μL de tampão fosfato a diferente pH (ente 4 e 8). Estes tampões fosfatos foram preparados misturando as soluções de H_3PO_4 , KH_2PO_4 , K_2HPO_4 0,1M até apresentarem pH entre 4 e 8.

3.5 Instrumentação e métodos de caracterização

3.5.1 Espectroscopia UV-Visível

Utilizou-se um espectrofotómetro de UV-Visível Cary 50 bio, utilizando uma célula de quartzo com passo óptico de 1 cm, entre comprimentos de onda de 300-1100 nm.

3.5.2 Microscopia de transmissão eletrónica (TEM)

As imagens de TEM (microscopia transmissão eletrónica) foram obtidas pelo Dr. Pedro Quaresma usando o aparelho HITACHI H-8100 operando a 200 kV (Departamento de Engenharia de Materiais do Instituto Superior Técnica da Universidade Técnica de Lisboa). Para preparar a amostra para análise de TEM usou-se uma grelha de cobre com revestimento de carbono na qual se colocou uma gota com cerca de 10 μ L de uma amostra de solução coloidal de NPs. Deixou-se secar e depois colocou-se uma gota de 10 μ L de água Mili Q de forma a lavar a amostra. Removeu-se o excesso de água e deixou-se novamente secar. Para a distribuição de tamanho das nanopartículas a partir das micrografias de TEM usou-se o programa *ImageJ* para determinar a seu tamanho e *OriginPro 8* para elaboração dos gráficos da distribuição e da análise estatística.

3.5.3 Medição por dispersão de luz (DLS)

O diâmetro hidrodinâmico foi determinado utilizando um aparelho Zeta Sizer Nano da Malvern com um laser de He-Ne (comprimento de onda de 633 nm) de 4 mW, com um ângulo fixo de detecção de 173°. As amostras das soluções coloidais colocaram-se numa célula adequada para este tipo de medições. As medições realizaram-se a uma temperatura de 25 °C com um intervalo de equilíbrio térmico de 120 segundos. Efetuaram-se 3 medições sendo que cada uma destas é o resultado de 50 leituras consecutivas.

3.5.4 Medições de potencial zeta (ζ)

As medições foram efectuadas no instrumento Zeta Sizer Nano da Malvern com um laser de He-Ne (comprimento de onda de 633 nm) de 4 mW, com um ângulo fixo de detecção de 17°, utilizando uma célula descartável (poliestireno com elétrodos metálicos revestidos a ouro, Malvern) apropriada para as medições de potencial Zeta. Para esta

análise utilizou-se 700 μL de uma solução de AuNPs, que foram introduzidas na célula lentamente com a ajuda de uma seringa de forma a garantir que não se formam bolhas de ar no interior da célula e que os elétrodos fiquem totalmente imersos. Fechou-se cada extremidade da célula e colocou-se no compartimento do aparelho de forma a realizar a medição. Mais uma vez efetuaram-se 3 medições sendo que cada uma destas é o resultado de 20 leituras consecutivas a uma temperatura de 25 °C com um intervalo de equilíbrio térmico de 120 segundos.

3.5.5 Análise por XPS

As amostras de NSs para a análise por XPS foram deixadas em incubação com CALNN durante 7 dias. A deposição foi efetuada colocando periodicamente volumes de 200 μL NS@CALNN num disco de carbono até se formar uma camada dourada. O disco foi deixado a secar no exsiccador de forma a remover a água. As experiências de XPS foram efetuadas utilizando um espectrómetro VG Scientific ESCALAB 200^a possuindo uma fonte de radiação monocromática $\text{AlK}\alpha$ (1486,6 eV) no Centro de Materiais da Universidade do Porto (CEMUP) pelo Doutor Carlos Sá. Foram efetuadas correções para a carga da amostra utilizando a banda C 1s a 285 eV como padrão interno.

A análise dos espectros foi efetuada utilizando o programa XPSpeak. O espectro desta região foi primeiramente ajustado com a linha de base através do método de Shirley tendo sido esta a linha de base previamente subtraída ao espectro original.⁶⁴

3.5.6 Medição por NTA

Para a análise por NTA efetuou-se uma diluição prévia da amostra em água milliQ de cerca de 100 a 1000 vezes e efetuou-se a injeção da amostra no sistema de microfluídica do aparelho. Esta medição foi realizada pelo Dr. Pedro Quaresma no NILU (Norsk institutt for luftforskning) em Oslo na Noruega. O aparelho utilizado foi NanoSight NS500 sendo a análise dos resultados efectuada no programa Nanoparticle Tracking Analysis (NTA) Version 2.3 Build 0033, ConcTest20.

Capítulo 4 – Síntese e caracterização de NPs

Neste capítulo descreve-se os resultados obtidos na síntese e caracterização das NPs utilizadas neste trabalho. Em que se aborda a síntese de nanopartículas em forma de estrela que foram obtidas a partir de dois métodos e contendo diferentes agentes de revestimento, o polímero polivinilpirrolidona e o anião citrato. Ambos os métodos de síntese destas partículas requerem um passo inicial de síntese de *seeds* (AuNPs/NPs), que são nanopartículas de ouro de forma esférica com aproximadamente 15 nm de diâmetro. As *seeds* formam o núcleo das nanoestrelas dado que funcionam como núcleos de cristalização onde ocorre deposição de átomos de ouro para formação de pontas.

4.1 Síntese e caracterização das nanopartículas de 15 nm - *seeds*

As nanopartículas de ouro de 15 nm (*seeds*) foram sintetizadas pelo método de Turkevich³⁴ e após a síntese trocou-se o agente de revestimento da síntese (citrato) por PVP, por incubação das nanopartículas com uma solução de PVP. Após lavagem por centrifugação e ressuspensão, as partículas foram caracterizadas por espectroscopia de UV/Vis, TEM e DLS para avaliar se tinham a forma e tamanhos pretendidos e se o procedimento de troca do agente de revestimento usado na síntese (citrato) por PVP não induzia alterações morfológicas ou na estabilidade coloidal das nanopartículas. Os espectros de UV/Vis obtidos para as nanopartículas com citrato e com PVP apresentam-se na figura 22. Ambos os espectros apresentam uma única banda intensa centrada a 527 nm (citrato) e 529 nm (PVP) tal como esperado para nanopartículas esféricas deste tamanho.³⁴ A ligeira variação do comprimento de onda máximo é típica da troca de agente de revestimento e é devida à variação do índice de refração do meio circundante.³⁴ Como se verifica na figura 22 ocorre uma ligeira perda da intensidade da banda plasmónica das partículas com a mudança de citrato para PVP, possivelmente devido a perda de partículas durante o processo de lavagem por centrifugação/ressuspensão.

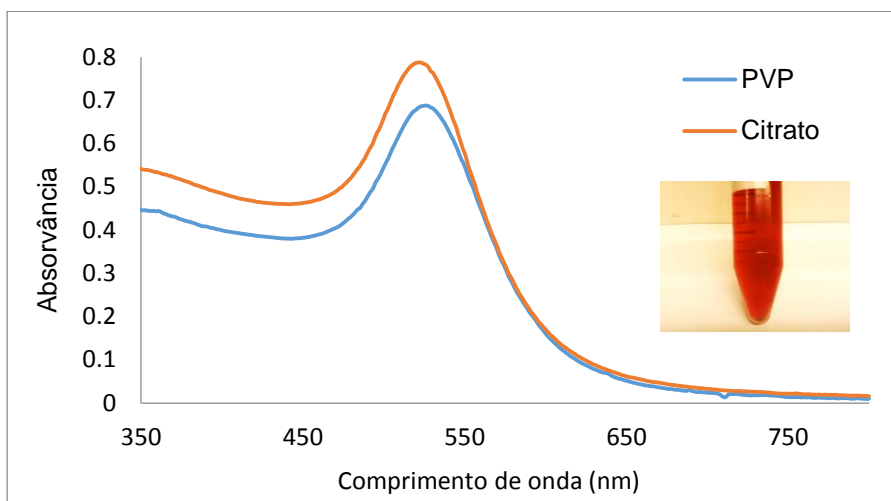


Figura 22. Espectros das nanopartículas de ouro de 15 nm com os agentes de revestimento citrato e PVP. A figura inserida é uma fotografia da solução de *seeds* revestidas com PVP.

Na figura 23 apresentam-se imagens de TEM representativas das NPs 15 nm revestidas com citrato. Estas partículas apresentam uma forma esférica e uma elevada homogeneidade, tal como se pode verificar pela imagem de TEM e pelo histograma de distribuição de diâmetros das NPs (figura 23).

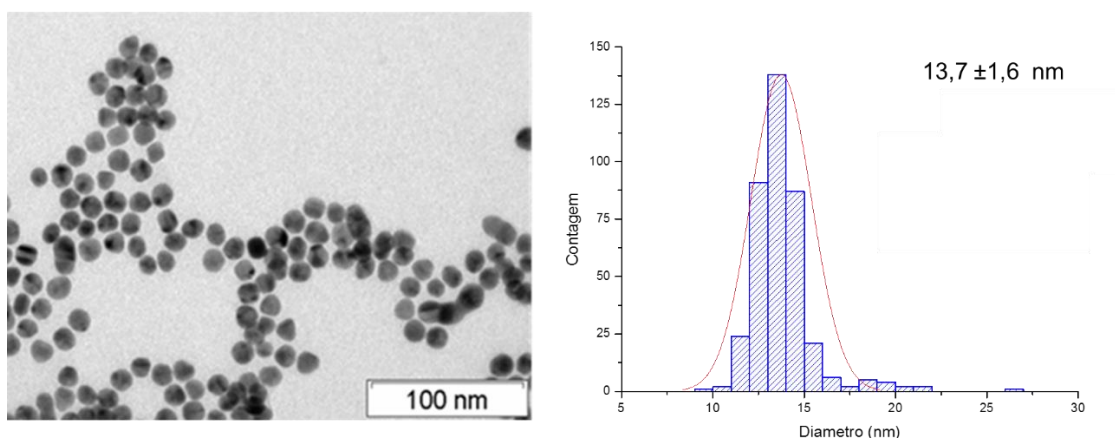


Figura 23. Imagem de TEM das AuNPs de 15 nm revestidas com citrato e o respetivo histograma de distribuição de diâmetros.

Tal como apresentado na figura 23 verifica-se que as partículas apresentam uma morfologia esférica e homogénea e que o diâmetro médio determinado através da análise das imagens de TEM foi de $13,7 \pm 1,6$ nm (foram medidas 116 nanopartículas).

Foi também efetuado um estudo por DLS destas partículas (figura 24). O valor obtido pela medição do diâmetro hidrodinâmico médio destas partículas foi de $69,5 \pm$

22,9 nm, muito longe do valor esperado de aproximadamente 15 nm tendo em conta o espectro de UV/Vis e também do valor determinado por TEM.

Ao comparar os diâmetros obtidos por estas duas técnicas normalmente os valores obtidos por DLS são superiores, pois a medição desta técnica inclui a esfera de solvatação, aumentando assim diâmetro medido.

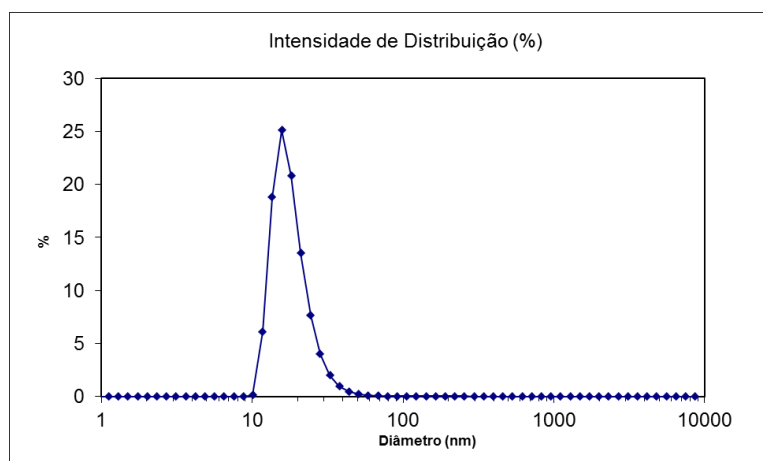


Figura 24. Dispersão do tamanho das NPs revestidas com citrato numa medição de diâmetro médio por DLS tendo em conta a percentagem de intensidade.

Outras explicações para a diferença do diâmetro obtido pelas duas técnicas, pode-se dever ao aparelho de DLS ser extremamente sensível a aglomerados de NPs o que leva a uma sobrevalorização dos agregados mesmo que estes não se encontrem em grande número. No entanto a hipótese de que existem quantidades significativas de agregados em solução deve ser descartada uma vez que na análise por UV/Vis não se verifica nem um desvio batocrómico considerável da banda plasmónica característica de partículas deste tamanho, nem a formação de uma nova banda a maiores comprimentos de onda o que seria de esperar se existisse uma quantidade de agregados significativa em solução. Outra possibilidade prende-se com a reduzida magnitude de dispersão de luz apresentada para partículas deste tamanho (que apesar de apresentarem uma extinção de luz significativa esta deve-se primariamente a fenómenos de absorção de luz em vez de dispersão de luz) que combinada com a baixa concentração de nanopartículas (na ordem dos nanomolar para este tipo de sínteses) pode levar a erros significativos por esta técnica.⁶²

4.2 Síntese e caracterização de nanoestrelas com PVP, AuNS@PVP

O método de síntese utilizada para a preparação das nanoestrelas de ouro, AuNSs, revestidas com PVP permite variar a sua morfologia, nomeadamente o número médio de pontas por partícula e o seu tamanho.^{35 36} Tal é conseguido variando a razão entre a concentração de precursor de ouro e a concentração de Au (0) presente nas *seeds*. Quanto menor esta razão, menor é a quantidade de ouro que se deposita por partícula, logo as NSs apresentam menor número de pontas e menor tamanho das pontas. De igual forma, para razões maiores a quantidade de ouro que se deposita por partícula é também maior, o que resulta em NSs com maior tamanho e maior número de pontas.^{35 36}

Neste estudo pretendeu-se sintetizar NSs com um elevado número de pontas, de forma a aumentar a área superficial das partículas comparativamente as partículas esféricas com o mesmo diâmetro. Para esse efeito, utilizaram-se quatro razões molares de precursor de ouro (III) para nanopartículas de 15, 30, 45 e 60. Visto que nesta síntese se mantém fixa a quantidade de precursor de ouro (III) adicionado, a alteração dessas razões efetua-se através da variação do volume de *seeds* utilizado. A concentração das *seeds* foi determinada por UV/Vis usando o método de Haiss.⁵⁴

Os espectros de UV/vis das NSs para as várias razões molares utilizadas na síntese apresentam-se na figura 25.

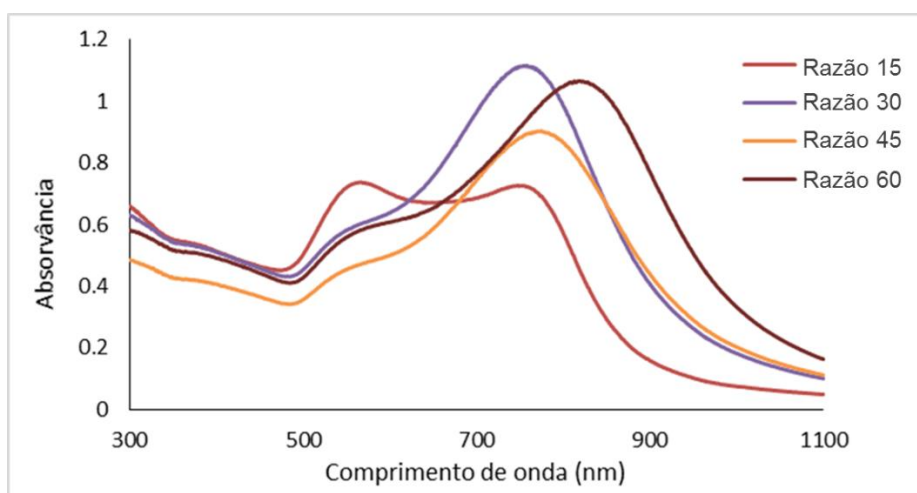


Figura 25. Espectros das soluções coloidais de NSs para as sínteses efetuadas com razões de concentração molares de 15, 30, 45 e 60.

Os espectros apresentam duas bandas plasmónicas intensas e largas, parcialmente sobrepostas, uma dela centrada a cerca de 550 nm que corresponde à ressonância plasmónica do núcleo das estrelas e a outra centrada no intervalo de 750-850 nm que corresponde à ressonância plasmónica das pontas das estrelas.^{35 36} Os comprimentos de onda dos máximos das bandas, bem como a razão de absorvâncias entre a banda a maior comprimento de onda (pontas) e a banda a menor comprimento de onda (núcleos) de cada espectro apresentam-se na tabela 3.

Tabela 3. Comprimentos de onda do máximo das bandas plasmónicas e razões de absorvância entre a plasmónica a maiores comprimentos de onda (pontas) e a plasmónica a menores comprimentos de onda (núcleo) para os diferentes rácios molares estudados (15, 30, 45, 60).

Razão	Máximo das plasmónicas		Razão da absorvância das bandas
	1º bandas	2º banda	
15	576	771	1,0
30	565	763	1,9
45	556	799	1,9
60	549	822	1,9

Observando a figura 25 e a tabela 3 verifica-se um desvio progressivo para comprimentos de onda mais elevados da segunda banda plasmónica com o aumento da razão molar utilizada. Isto deve-se, tal como esperado, ao facto de para rácios maiores existir uma quantidade de ouro maior por *seed* utilizada, levando assim à formação de estrelas maiores e com um maior número de pontas. Visto que a segunda banda plasmónica possui uma elevada contribuição relativa às pontas das nanopartículas, qualquer aumento no número de pontas e/ou crescimento destas leva a um desvio para o vermelho da banda plasmónica correspondente.²³ A intensidade relativa das duas bandas plasmónicas é também alterada através da alteração do rácio verificando-se um aumento significativo da intensidade da segunda banda plasmónica e uma diminuição da razão das absorvâncias do rácio 15 para rácios mais elevados.

De maneira a verificar se estas alterações na morfologia das nanoestrelas são a causa para a variação obtida pelo UV/Vis recorreu-se à análise por TEM para as razões molares de 15 e 60 visto estas corresponderem aos valores extremos utilizados. Na figura 26 apresentam-se imagens representativas.

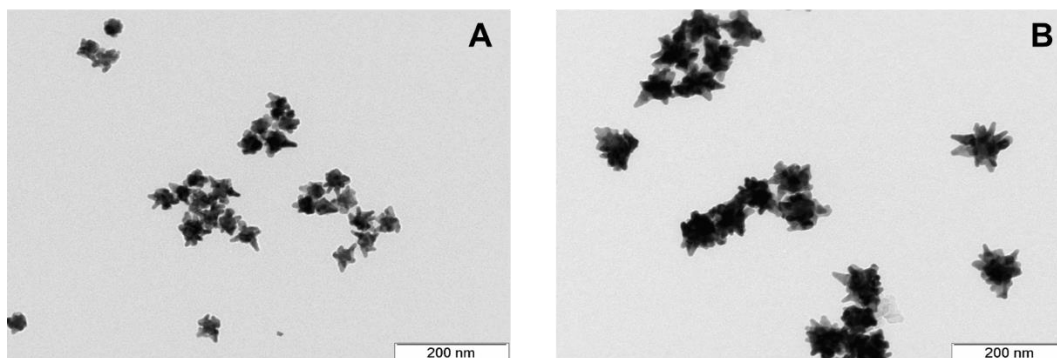


Figura 26. Imagens obtidas por TEM de nanoestrelas sintetizadas com razões molares de 15 (A) e 60 (B).

Verifica-se na figura 26 que, embora ambas as amostras apresentem uma homogeneidade significativa, existem diferenças significativas entre elas. Observa-se que as NPs formadas no caso da razão 15 apresentam um menor tamanho e menor número de pontas que para o caso da razão 60. De maneira a confirmar esta observação as imagens obtidas foram analisadas por medição do tamanho das NPs (considerando o maior diâmetro possível de medir - de ponta a ponta), número médio de pontas e o comprimento das pontas (considerando o tamanho da ponta o limite do núcleo, parte mais escura da imagem de TEM, até a extremidade da ponta, altura da ponta. Os resultados encontram-se resumidos na tabela 4.

Tabela 4. Resumo das medidas efetuadas por TEM das nanoestrelas sintetizadas com razões molares de 15 e 60.

Razão	Nº de pontas por partícula	Diâmetro médio partícula (nm)	Tamanho médio das pontas por partícula (nm)	Número de partículas analisadas
15	5 ± 1	$57,3 \pm 9,8$	22 ± 6	177
60	11 ± 2	$94,3 \pm 14,2$	36 ± 9	277

Tal como consta na tabela 4 confirma-se que para rácios molares superiores ocorre a formação de um maior número de pontas assim como um aumento do diâmetro da partícula e das pontas respetivas. Tal facto encontra-se em consonância com os resultados de UV/Vis, que como referido mostram um desvio para maiores comprimentos de onda da segunda banda plasmónica, podendo ser atribuído ao maior número e tamanho das pontas formadas por partícula para maiores razões molares.

Para a continuação do estudo utilizamos as NSs de razão 60 pois apresentam tamanho superior assim como um maior número de pontas por partícula. Tal facto resulta numa maior área superficial ideal para poder alojar na sua superfície um maior número possível de biomoléculas.

O passo seguinte no estudo consistiu no aumento da escala da síntese de maneira a obter uma maior quantidade de partículas para os estudos subsequentes de funcionalização e conjugação. Para esse efeito duplicou-se o volume de síntese mantendo todos os outros parâmetros e condições constantes. Efetuaram-se espectros de UV/Vis da síntese em maior escala e comparou-se com o obtido anteriormente (figura 27).

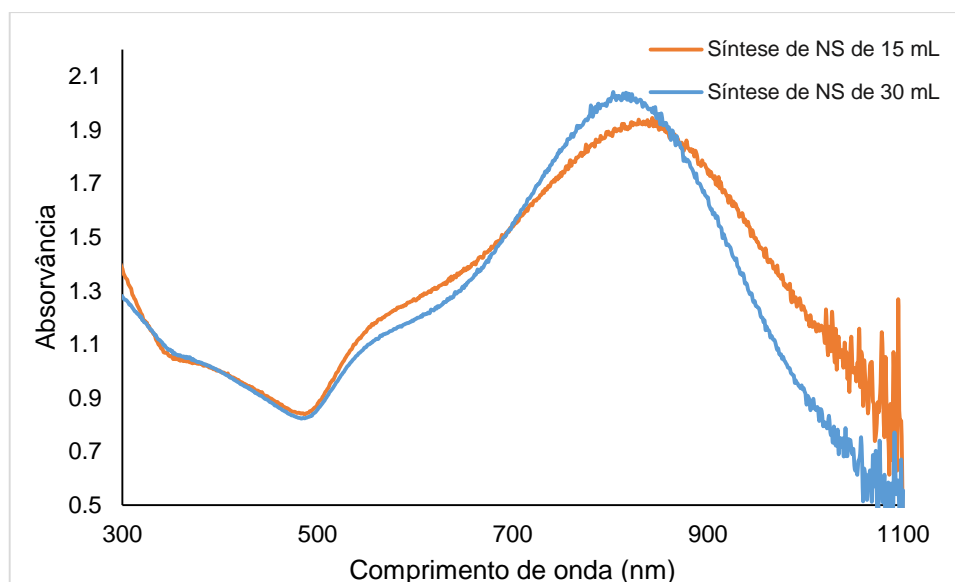


Figura 27. Espectros das NSs de razão 60 da síntese de 15 mL e 30 mL. O espectro foi normalizado a 400 nm.

Os espectros apresentados foram normalizados para uma absorvância igual a 1 a 400 nm. A este comprimento de onda a absorvância de nanopartículas é proporcional à quantidade total de ouro metálico em solução,³⁶ pelo que a normalização permite uma melhor comparação de espectros e eliminar diferenças que se possam dever a diferentes perdas de partículas durante o processo de lavagem. Verifica-se que aumentando o volume total da síntese ocorre um desvio da segunda banda plasmónica para menores comprimentos de onda, de 817 nm para 851 nm. Este comportamento indica uma possível diminuição do tamanho de partícula e/ou diminuição do número e tamanho de pontas por partícula. De maneira a confirmar esta possível alteração de morfologia efetuaram-se análises por TEM, encontrando-se as imagens e histogramas obtidos na figura 28 e os resultados resumidos na tabela 5.

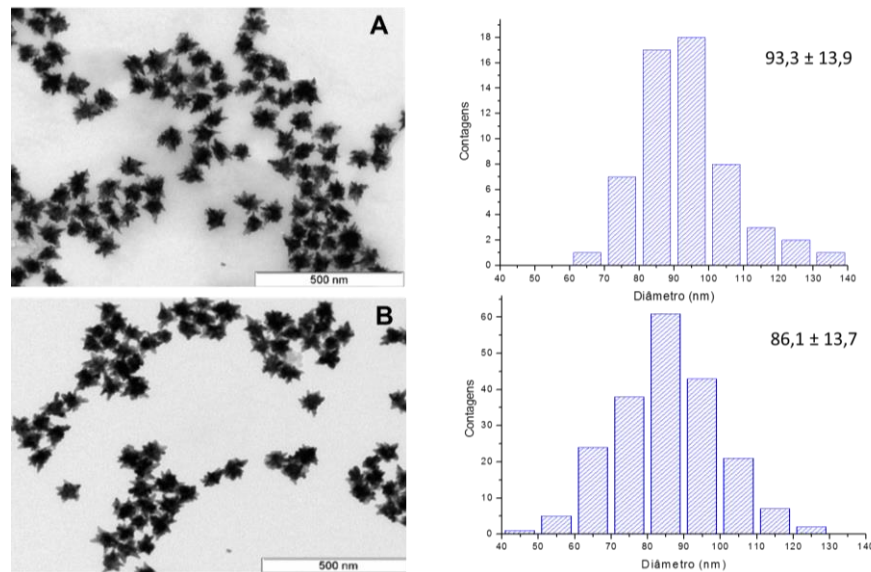


Figura 28. Imagem de TEM de uma amostra da solução de NSs da síntese de 15 mL (A) e 30 mL (B) e o respetivo histograma de tamanhos (à direita).

Tabela 5. Tamanho das NSs das diferentes sínteses determinada por TEM.

Volume total de síntese	Nº de pontas por partícula	Diâmetro médio partícula (nm)	Tamanho médio das pontas por partícula (nm)	Número de partículas analisadas
15 mL	11 ± 2	94,3 ± 14,2	36 ± 9	277
30 mL	8 ± 2	86,1 ± 13,7	32 ± 5	202

Verifica-se na figura 28 que ambas as amostras continuam a ser consideravelmente homogêneas em termos de forma e que a única diferença relevante é uma diminuição do diâmetro médio das partículas para o caso do *scaleup*, em tal como esperado pelos resultados de UV/Vis reportados anteriormente. Ocorre também uma pequena diminuição no número médio de pontas por partícula e do seu tamanho. Esta pequena diminuição poder-se-á dever a pequenas variações nas condições de síntese, por exemplo condições de agitação e mistura de reagentes. No entanto esta pequena variação não é significativa tendo em conta os objetivos do trabalho, pelo que estas condições foram utilizadas para as experiências de funcionalização subsequentes.

Utilizou-se a técnica de NTA para determinar o diâmetro das partículas e a concentração de partículas. Os resultados obtidos encontram-se na figura 29.

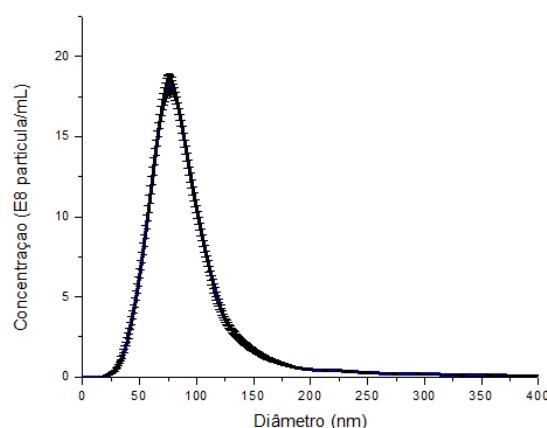


Figura 29. Representação gráfica da concentração de NPs por diâmetro obtida por NTA, através da média de 6 leituras consecutivas.

Os resultados de diâmetro hidrodinâmico obtidos por esta técnica assim como o desvio padrão encontram-se na tabela 6, juntamente com os valores obtidos por TEM para comparação.

Tabela 6. Valores médios do diâmetro hidrodinâmico (NTA) e diâmetro medido por TEM das NSs obtidas com uma razão molar de 60.

Técnica	Diâmetro médio (nm)
TEM	$86,1 \pm 13,7$
NTA	$77,8 \pm 69,4$

Os valores médios obtidos por estas técnicas são relativamente próximos, embora o diâmetro hidrodinâmico obtido por NTA seja menor do que o tamanho determinado por TEM. Tal deve-se provavelmente ao facto de o valor obtido por NTA, calculado a partir da mobilidade das partículas, corresponder ao diâmetro de uma esfera com uma mobilidade semelhante. Já no TEM a medição do tamanho das estrelas foi feita de ponta a ponta da estrela. Por outro lado, as amostras analisadas são de sínteses diferentes, pelo que pode também haver alguma variabilidade do tamanho médio das NSs em cada uma das sínteses. Verifica-se um desvio padrão da população consideravelmente mais elevado para a técnica de NTA do que o obtido por TEM. Mais uma vez isto poder-se-á dever as dificuldades relativas à medição precisa da mobilidade de nanopartículas anisotrópicas. Outra possibilidade prende-se com o facto de esta técnica poder também contabilizar agregados de dimensões significativas o que levaria a um aumento considerável do desvio padrão calculado relativamente ao apresentado por TEM no qual se medem unicamente partículas individualizadas. Este

comportamento indica que a medição feita por NTA é fiável relativamente à medição por imagem de TEM embora apresente um desvio padrão significativamente superior.

A grande vantagem desta técnica prende-se com a possibilidade da medição direta de concentrações molares. Dessa forma e utilizando os dados de UV/Vis anteriormente apresentados foi possível calcular também o coeficiente de extinção molar destas partículas. Este coeficiente foi calculado para o comprimento de onda de 450 nm de maneira a poder efetuar uma comparação com valores de literatura descritos para esferas de tamanho equivalente. Estes valores encontram-se resumidos na tabela 7.

Tabela 7. Concentração obtida a partir da técnica NTA, coeficiente de extinção molar calculado utilizando a absorvância aos 450 nm e o valor de literatura da extinção molar para NPs esféricas com o mesmo diâmetro das NS.

Concentração	Partícula / mL	Molar (mol dm^{-3})	$\epsilon_{450 \text{ nm}}$ calculado (mol $\text{L}^{-1}\text{cm}^{-1}$)	$\epsilon_{450 \text{ nm}}$ esferas literatura (mol $\text{L}^{-1}\text{cm}^{-1}$)
AuNS@PVP (razão 60)	$(10,86 \pm 0,25) \times 10^{+10}$	$(6,01 \pm 1,39) \times 10^{-10}$	$4,91 \times 10^{+10}$	$4,65 \times 10^{+10}$

Verifica-se na tabela 7 que a amostra de NSs apresenta uma concentração de 0,06 nM em estrelas, um valor muito consistente com o valor aproximado de 0,07 nM que é possível calcular utilizando unicamente a concentração de *seeds* usadas na síntese. Este cálculo assume que todas as *seeds* de ouro adicionadas na síntese originam NSs (ou seja não ocorre nova nucleação e formação de partículas), tem em conta todas as diluições efetuadas durante a síntese e assume também que não ocorrem perdas durante o processo de lavagem das NSs. O facto de este valor ser ligeiramente superior ao determinado por NTA poderá facilmente dever-se às perdas nas centrifugações utilizadas no processo de lavagem e indicam que o valor obtido por NTA é plausível.

O cálculo do coeficiente de extinção molar permitiu obter um valor semelhante ao coeficiente de extinção molar de partículas esféricas de diâmetro equivalente (86 nm) obtido na literatura para o comprimento de onda de 450 nm.⁶⁷ Esta semelhança deve-se não só ao facto dos seus tamanhos equivalentes mas devido ao facto de nesta zona espectral não existirem grandes diferenças entre os espectros de NPs esféricas e NSs. Foi efetuado também o cálculo dos coeficientes de extinção molar para o comprimento de onda dos máximos de absorvância das NSs referente à banda do núcleo e comparado com os valores para o máximo de absorvância das NPs esféricas. Estes valores encontram-se apresentados na tabela 8.

Tabela 8. Valores da extinção molar das NPs de 15 nm a partir da absorvância do pico (528 nm) e das NSs de 86 nm a partir da absorvância da banda referente ao núcleo (578 nm).

Nanopartículas de 15 nm	Nanoestrelas de 86 nm
$\epsilon_{528 \text{ nm}} \text{ calculado (molL}^{-1}\text{cm}^{-1}\text{)}$	$\epsilon_{578 \text{ nm}} \text{ calculado (molL}^{-1}\text{cm}^{-1}\text{)}$
$5,2 \times 10^8$	$1,9 \times 10^9$

Como se pode verificar os coeficientes de extinção molar para as NSs apresentam valores quase uma ordem de grandeza superior ao apresentado pelas NPs esféricas, confirmando a maior intensidade do fenómeno de ressonância plasmónica para as NSs.

4.3 Síntese e caracterização de nanoestrelas de ouro usando AgNO_3 e ácido ascórbico, AuNS@Citrato

Esta síntese foi baseada no método descrito por Tuan Vo-Dinh *et al.*³⁷ em que se obtêm nanopartículas em forma de estrela usando *seeds* de citrato de 15 nm com uma posterior adição de ácido ascórbico (AA) e nitrato de prata. Tal como no método anterior este requer a utilização de *seeds* esféricas pré-sintetizadas no entanto não requer a sua pré-funcionalização podendo estas ser diretamente utilizadas após a sua síntese. Possui também a vantagem significativa de não requerer a utilização de solventes orgânicos assim como de polímeros que são de difícil substituição após a síntese, caso seja requerida uma funcionalização diferente das NPs.

Nesta síntese o ácido ascórbico funciona como um redutor fraco que favorece a formação de nanopartículas anisotrópicas e que não é suficientemente forte para iniciar a formação de novos núcleos de cristalização, de maneira que o ouro utilizado na etapa de crescimento é apenas reduzido na superfície das *seeds*. Os iões prata possuem neste método a função de promover o crescimento das pontas sendo a sua concentração um dos principais parâmetros que condicionam o número e forma das pontas que se desenvolvem. Na figura 30 apresenta-se um esquema do procedimento efetuado.

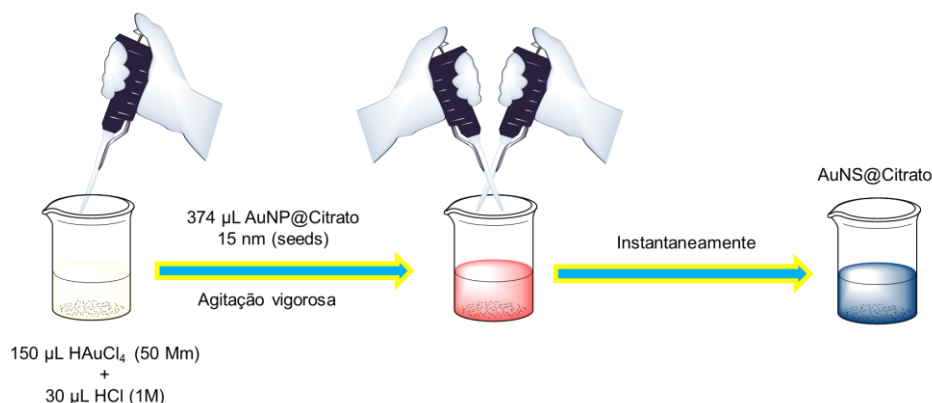


Figura 30. Esquema do procedimento de síntese das AuNS@Citrato.³⁷

Este procedimento é muito sensível à forma como os reagentes são adicionados. Após a adição das *seeds*, a adição de solução de nitrato de AgNO₃ e de solução de ácido ascórbico tem de ser rápida e em simultâneo. Esta forma de adição é crítica uma vez que caso o ácido ascórbico seja adicionado antes, este irá reduzir o ouro presente (na superfície das *seeds*) sem que haja a formação de pontas (direcionadas pela presença da prata) ao passo que se a prata for adicionada antes ocorre precipitação de cloreto de prata antes que possam efetuar a sua função nesta síntese.

Nestas condições, após a adição a solução torna-se instantaneamente azul, cor típica das NSs de ouro. Após a síntese as nanopartículas foram lavadas por centrifugação/ressuspensão em água, tal como descrito no procedimento publicado.³⁷ No processo de lavagens observou-se que as nanopartículas adsorvem ao tubo de centrífuga, não sendo possível ressuspendê-las completamente. Esta falta de estabilidade coloidal pode se dever à solução apresentar um pH muito ácido (2-3), devido à adição inicial de ácido clorídrico. Assim, analisou-se a influência deste reagente na formação de NSs, efetuando sínteses comparativas com e sem adição de ácido inicial. Na figura 31 apresentam-se os espectros de UV/Vis das NSs obtidas na presença e na ausência de ácido clorídrico.

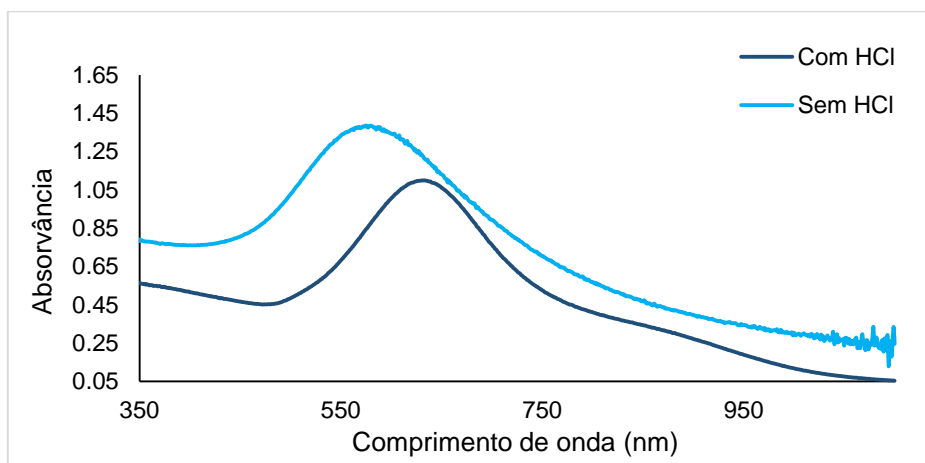


Figura 31. Espectros das AuNS@Citrato com e sem a adição de HCl na síntese.

Observa-se que os espectros das NSs obtidas com HCl apresentam duas bandas definidas a 624 nm e a cerca de 850 nm, enquanto o espectro das NSs obtidas sem ácido apresenta apenas uma banda larga a cerca de 585 nm. Estes resultados indicam que na presença de HCl as nanopartículas formadas são maiores e/ou com pontas mais desenvolvidas e em maior número. Na síntese efetuada sem o ácido poderá existir uma maior dispersão de tamanhos, devido à largura da banda, embora possa apresentar NPs com pontas desenvolvidas.

De maneira a verificar estas hipóteses, as amostras foram também caracterizadas por TEM, usando o programa ImageJ para efetuar a medição das nanopartículas. Os resultados apresentam-se na figura 32.

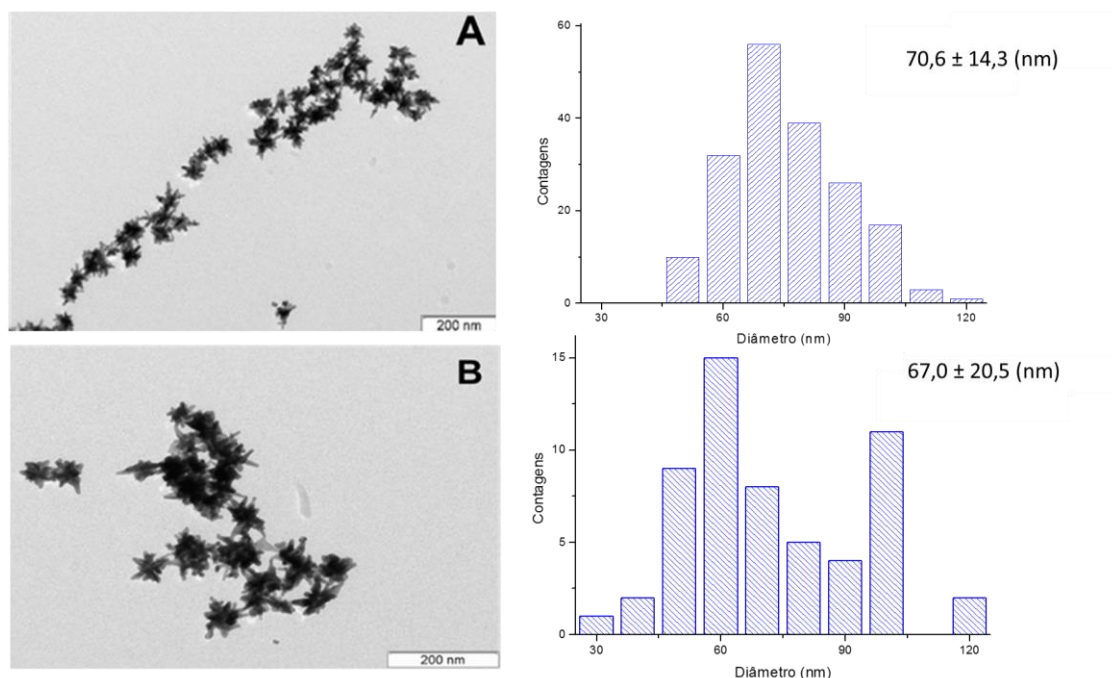


Figura 32. Imagens de TEM das NSs sintetizadas com HCl (A) e o respetivo histograma da distribuição de tamanho (à direita em cima) e das NSs sintetizadas sem HCl (B) e o respetivo histograma da distribuição de tamanhos (à direita em baixo).

Em ambas as sínteses obtiveram-se amostras constituídas apenas por partículas em forma de estrela. Mais uma vez as imagens obtidas foram analisadas de maneira a medir o tamanho médio das NPs (considerando o maior diâmetro possível de medir - de ponta a ponta), número médio de pontas e o seu tamanho médio sendo que os resultados encontram-se resumidos na tabela 9.

Tabela 9. Dados estatísticos referentes às NSs sintetizadas com e sem HCl.

Síntese	Nº de pontas por partícula	Diâmetro médio partícula (nm)	Tamanho médio das pontas por partícula (nm)	Número de partículas analisadas
HCl	7 ± 1	$70,6 \pm 14,3$	$32,2 \pm 6,5$	57
sem HCl	5 ± 1	$60,7 \pm 20,5$	$25,8 \pm 6,8$	184

As partículas sintetizadas com HCl apresentam uma distribuição de tamanhos mais homogêneos, apresentando um tamanho médio de 70 ± 14 nm, e em geral uma elevada uniformidade do crescimento das pontas em cada partícula. O histograma de distribuição de tamanhos tem uma distribuição próxima da normal com um pequeno desvio da distribuição na zona de maiores tamanhos. As partículas que foram sintetizadas sem HCl apresentam uma maior dispersão de tamanhos, apresentando um

tamanho médio de 67 ± 21 nm. Verifica-se que as NSs sintetizadas sem ácido apresentam um crescimento menos uniforme das pontas, aumentando a sua polidispersão de tamanhos e irregularidade da forma. Os resultados obtidos indicam que a presença de ácido clorídrico na síntese, embora não seja imprescindível para a obtenção de nanoestrelas, permite obter nanoestrelas com uma forma mais regular e menor dispersão de tamanhos.

Dada a importância da presença de HCl no processo de síntese, tentaram-se duas outras abordagens para evitar a agregação e adesão das nanopartículas ao tubo de centrífuga durante o processo de lavagem. Na primeira abordagem ajustou-se o pH entre 7-8 por adição de NaOH antes da lavagem, ao passo que na segunda abordagem para além do ajuste de pH adicionou-se também citrato de sódio de maneira a aumentar a concentração de agente de revestimento em solução (aumentando a estabilidade).

Variou-se também a velocidade e tempo de centrifugação, mas em nenhum dos casos foi possível evitar a agregação/adesão das NSs. Na figura 33 apresentam-se os espectros das NSs antes e depois da lavagem por centrifugação/ressuspensão e com adição de citrato/ajuste de pH. Verifica-se uma redução significativa da absorvância da banda plasmónica das partículas, bem como um desvio acentuado do máximo para maiores comprimentos de onda, depois da lavagem, independentemente da adição de citrato e ajuste de pH.

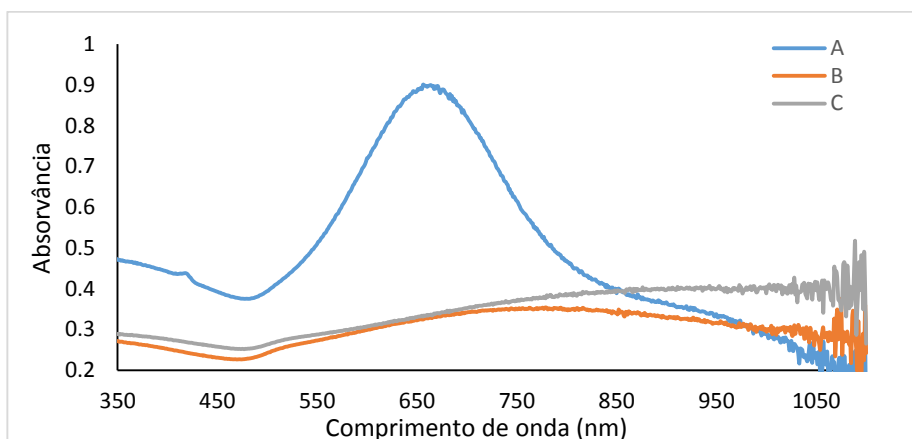


Figura 33. Comparação dos espectros das AuNS@Citrato após a síntese (A), com ajuste de pH e posterior lavagem (B) e com ajuste de pH e adição de citrato e posterior lavagem.

Verificou-se ainda que as soluções coloidais obtidas na síntese apresentavam uma mudança gradual de cor de azul para lilás no intervalo de cerca de 12 horas. Esta mudança de cor tinha sido já relatada na literatura e relacionada com uma mudança de morfologia das NS na qual vão tendendo progressivamente para uma forma esférica.

Pensa-se que esta mudança morfológica é devida à presença de anião cloreto em solução e ocorre através de um mecanismo de redissolução/deposição de ouro que é catalisado pelo anião cloreto.⁷⁰

Para estabilizar a morfologia das nanoestrelas sintetizadas e dado que não foi possível lavá-las por centrifugação/ressuspensão, efectuou-se uma troca do agente de revestimento imediatamente após a síntese. Os resultados relativos à funcionalização serão apresentados no capítulo 5.

Capítulo 5 - Funcionalização das AuNS

5.1. Funcionalização das AuNS@PVP

As NSs contêm na sua superfície PVP, formado por múltiplas cadeias de vinilpirrolidona (figura 34). Este polímero não apresenta toxicidade, sendo muito utilizado na indústria farmacêutica e cosmética. No entanto para a formação de bionanoconjugados é necessário a sua substituição por um agente de revestimento que aumente a biodisponibilidade das NPs para adsorver à sua superfície biomoléculas. Nesta parte do estudo o agente de revestimento usado para substituir o PVP foi o pentapéptido CALNN sendo este um péptido constituído por cinco aminoácidos, nomeadamente cisteína, alanina, leucina e duas asparaginas (do terminal N para o terminal C, figura 348). Este pentapéptido foi já utilizado para a formação de bionanoconjugados com tirosinase utilizando partículas esféricas.⁶⁹ Estes apresentaram um aumento da atividade enzimática pelo que neste trabalho se escolheu começar a funcionalização com este péptido usando as nanoestrelas invés de NPs esféricas.

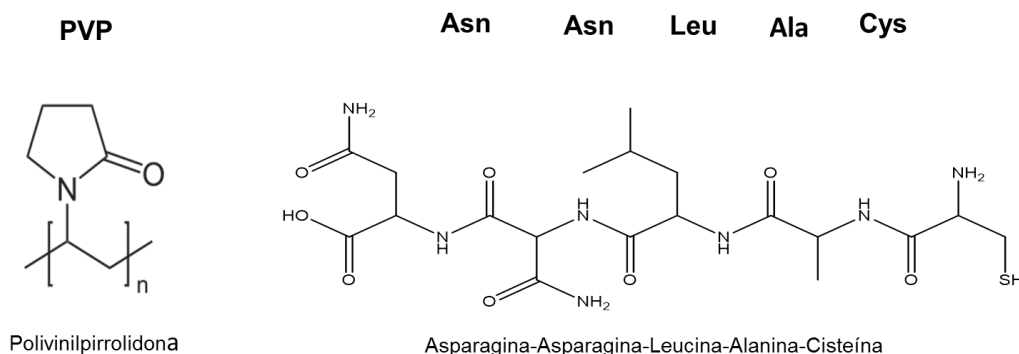


Figura 34. Estrutura química dos agentes de revestimento PVP e CALNN.

A substituição de polímeros, tais como o PVP, da superfície de nanopartículas é muitas vezes difícil, porque a adsorção ocorre através de múltiplos grupos funcionais no polímero, aumentando assim a sua estabilidade termodinâmica e cinética. Além disso, a substituição por moléculas pequenas também é contrariada pelo factor entrópico. Assim, foi necessário otimizar as condições para a troca de agente de revestimento. Seguidamente apresentam-se apenas os resultados relativos aos procedimentos otimizados.

Começou-se por remover o excesso de PVP da solução. Para tal lavaram-se as nanopartículas 5 vezes por ciclos de centrifugação/ressuspensão. Para verificar a

eficácia deste procedimento analisou-se por espectroscopia de UV/Vis o sobrenadante de cada uma das centrifugações. Os resultados apresentam-se na figura 35.

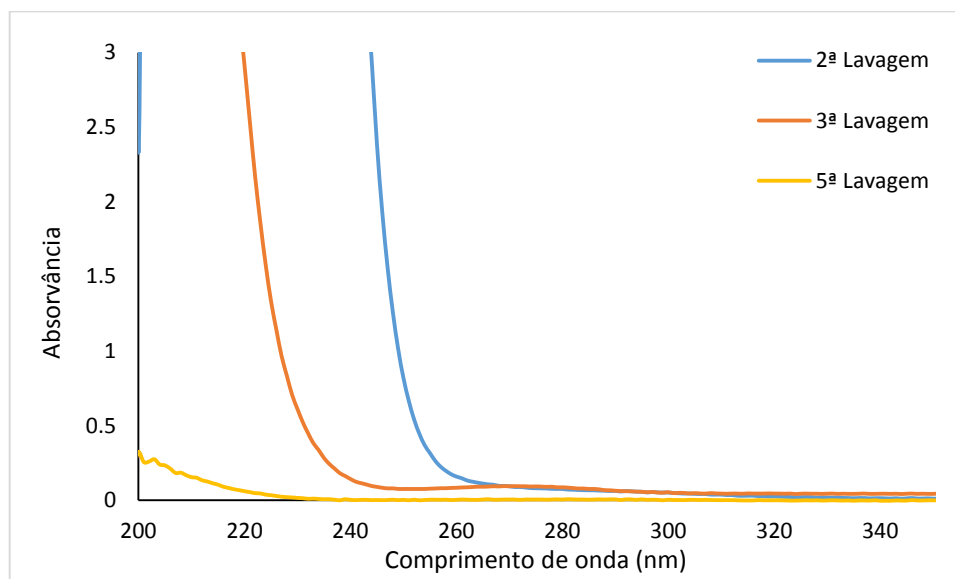


Figura 35. Espectros do sobrenadante das lavagens da solução coloidal das NSs.

Verifica-se que ocorre uma diminuição da intensidade da banda característica deste polímero entre os 200 - 300 nm indicando perda de PVP entre cada ciclo de lavagens, até à quinta lavagem para qual a absorvância entre 200 e 300 nm é praticamente nula, indicando que a quantidade de PVP em solução é apenas residual.

Este processo de lavagem teve como objetivo apenas a remoção parcial do PVP que se encontra a superfície da partícula visto que a remoção total de um agente de revestimento pode levar a agregação das partículas. Nas próximas secções serão apresentados os resultados da troca do PVP remanescente por outros agentes de revestimento.

5.1.1 Funcionalização das AuNS@PVP com o pentapéptido CALNN

Na figura 36 apresenta-se um diagrama que descreve resumidamente o processo bem como a caracterização efetuada das nanopartículas funcionalizadas.

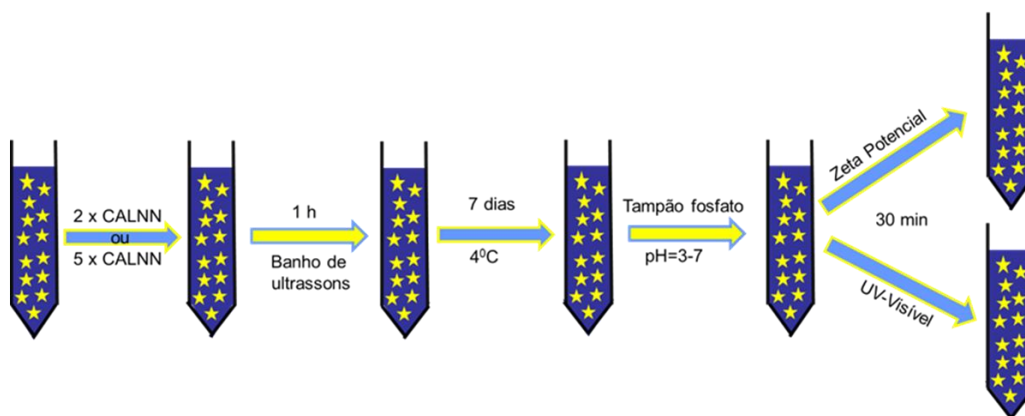


Figura 36. Esquema do procedimento utilizado para a funcionalização das partículas com CALNN.

Um factor importante no processo de troca de agente de revestimento à superfície de uma nanopartícula é a utilização de um largo excesso do agente de revestimento que se pretende obter em redor da NP de maneira a deslocar o equilíbrio de dessorção/adsorção no sentido da substituição. Este excesso é ainda mais importante no caso da remoção de agentes de revestimento poliméricos. O cálculo deste excesso de ligando foi efetuado da seguinte forma. Primeiramente usaram-se os valores de diâmetro médio determinados por TEM (secção 4.2) para calcular a área superficial da NP, assumindo que esta teria uma morfologia esférica. Este cálculo constitui uma aproximação grosseira, dado que não contabiliza o aumento de área superficial devido à forma de estrela, mas permite obter uma ordem de grandeza sobre a área disponível para ligação. Seguidamente, calculou-se o número de moléculas de agente de revestimento que poderão geometricamente ocupar essa área superficial com base na área superficial ocupada por uma molécula de MUA, determinada na literatura de $5,7 \text{ nm}^2$.⁶⁸ Este valor será em princípio inferior à área ocupada pelas moléculas de CALNN que não devem formar uma monocamada tão compacta como um alcanotiol, pelo que o erro nesta estimativa deve ser por excesso. Por fim, calculou-se a quantidade de agente de revestimento necessária a obter uma monocamada completa na superfície de todas as NPs existentes num determinado volume de solução, usando a concentração de NPs obtida por NTA. Visto que este cálculo ser bastante aproximado e ser necessário sempre um excesso de agente de revestimento, experimentaram-se excessos molares correspondentes a 2 e 5 vezes esta quantidade (figura 36).

Após a adição do pentapéptido CALNN deixou-se a solução em banho de ultrassons de forma a favorecer a troca de agente de revestimento. A formação de zonas de cavitação promovidas pelos ultrassons pode permitir a dessorção do PVP permitindo a penetração do CALNN e facilitando a quimiossorção (mais estável

termodinamicamente) do grupo tiol do resíduo de cisteína e do grupo terminal amina do péptido às NSs. Seguidamente deixou-se a incubar durante 7 dias para assegurar que o processo é o mais completo possível, dado que se sabe que a cinética de dessorção do PVP é bastante lenta.

Estudou-se a evolução da funcionalização das NSs com CALNN durante 7 dias, por medição do potencial (por DLS) e por estudos de agregação com o pH utilizando espectroscopia de UV-Visível no intervalo de pH entre 3 e 7. Estes estudos de agregação com o pH baseiam-se na diferente estabilidade coloidal das nanopartículas revestidas com CALNN e revestidas com PVP a valores baixos de pH. As nanopartículas com CALNN tornam-se progressivamente menos negativas à medida que se diminui o pH, devido à protonação do grupo carboxílico do aminoácido terminal asparagina. A diminuição da carga superficial diminui a estabilidade coloidal provocando agregação das partículas. Por outro lado, as partículas com uma quantidade significativa de PVP à sua superfície não agregam tão facilmente mesmo a valores de pH muito baixos, porque o polímero estabiliza as nanopartículas não só pela sua carga superficial mas também pela repulsão estereoquímica criada pela camada de polímero.⁷⁰ A agregação das nanopartículas pode ser detetada por espectroscopia de UV/Vis pela diminuição da intensidade das bandas plasmónicas e pela perda da coloração das soluções coloidais.

Na figura 37 apresentam-se os espectros das NS@PVP sem qualquer tratamento e após incubação com CALNN durante 0, 3, 5 e 7 dias, a pH entre 3 e 7. Note-se que o ajuste de pH só foi efetuado após o tempo de incubação indicado.

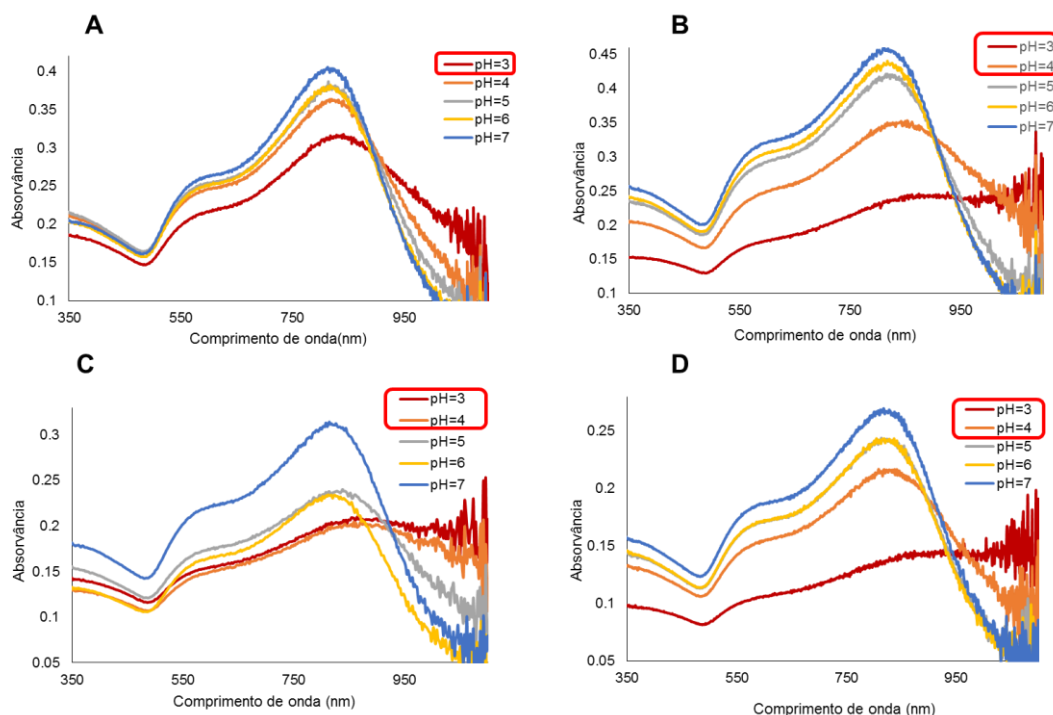


Figura 37. Espectro das AuNS para uma gama de pH entre 3 e 7 a diferentes tempos após a adição de CALNN: (A) Antes da adição, (B) 3 dias, (C) 5 dias e (D) 7 dias após a adição.

Para as NS@PVP verifica-se que entre pH 4 e 7 não existem alterações muito significativas do espectro, ocorrendo apenas uma ligeira diminuição da absorvância e um ligeiro desvio do máximo para maiores comprimentos de onda, indicativo de que poderá existir alguma agregação, mas em pequena escala. Para pH=3, o espectro apresenta uma diminuição significativa da absorvância da banda plasmónica, bem como um desvio significativo das bandas para maiores comprimentos de onda, indicativo de ocorrência de agregação moderada. Para as NSs após a adição de CALNN e incubação durante 3, 5 e 7 dias observa-se um comportamento semelhante, mas com evidência de ocorrência de agregação mais extensa e a valores de pH mais altos logo ao fim de um dia. Para maiores tempos de incubação verifica-se uma maior variação dos espetros com o pH, indicando a ocorrência de agregação em maior extensão.

No decorrer da incubação mediu-se também o potencial zeta no início e após 3, 5 e 7 dias após a adição do pentapéptido. Na figura 42 apresenta-se um gráfico da evolução do potencial zeta no decorrer do tempo aos vários valores de pH.

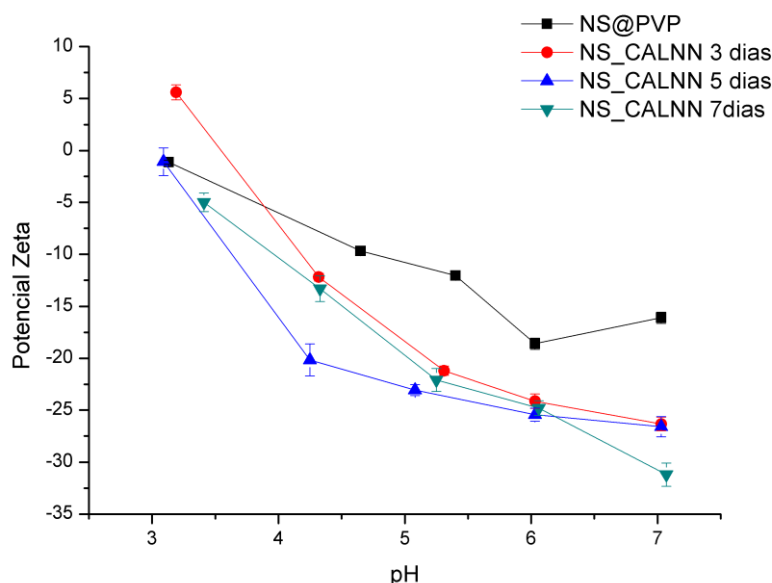


Figura 38. Evolução do potencial zeta das NSs com CALNN no decorrer da incubação.

Como se pode verificar na figura 38, as AuNS@PVP apresentam um potencial de cerca -15 mV a pH 7 que aumenta ligeira e gradualmente à medida que se diminui o pH até praticamente zero a pH 3. Ao longo da incubação com CALNN, o potencial zeta a pH 7 diminui para cerca de -26 mV ao fim de 3 e 5 dias e para cerca de -30 mV ao fim de 7 dias, indicando ocorrência de substituição do PVP por CALNN. Nestes casos, a forma como o potencial zeta varia com o pH é também bastante diferente, verificando-se um aumento muito mais acentuado do potencial zeta à medida que se diminui o pH, até um valor próximo de zero para pH 3. Este comportamento é o esperado para NPs com CALNN, como agente de revestimento, pois à medida que se diminui o pH ocorre protonação dos grupos carboxílicos terminais, diminuindo o valor absoluto da carga superficial. Quando a superfície das NPs apresentam uma carga neutra deixa de haver forças repulsivas entre as NPs favorecendo a agregação das mesmas.

Dado que ao pH 3 e 4 mesmo as AuNS@PVP mostraram alguns sinais de agregação, efetuou-se um novo estudo da estabilidade coloidal das partículas para pH 5 e 6, com uma incubação de 7 dias com os diferentes agentes de revestimento. Os resultados de espectroscopia de UV/Vis apresentam-se na figura 39.

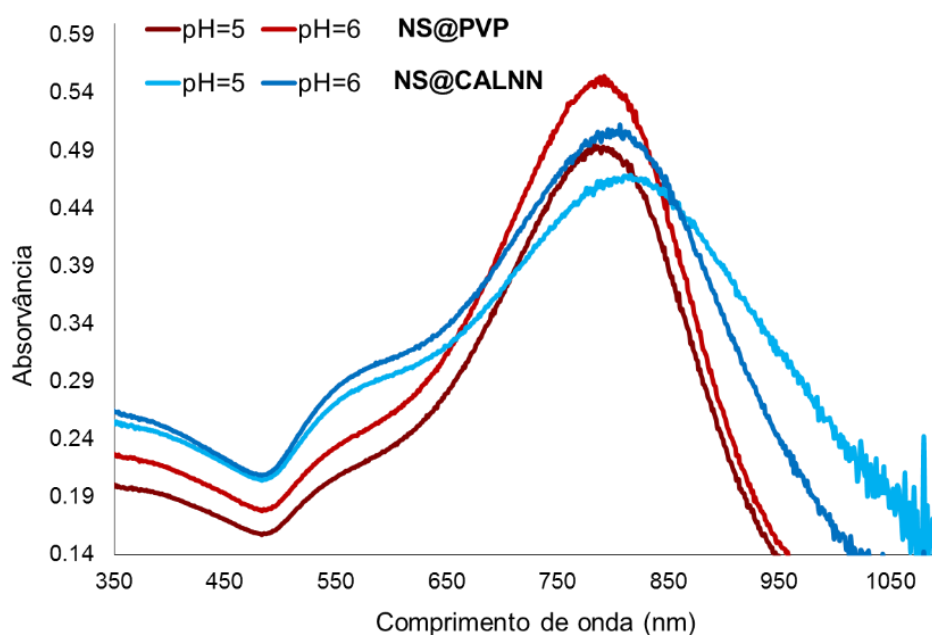


Figura 39. Espectros das NS@PVP e NS@CALNN o pH 5 e 6.

Comparando os espectros das diferentes partículas verifica-se que as partículas incubadas com CALNN apresentam espectros com menor intensidade de banda em relação às NPs com PVP ao mesmo pH, evidenciando a ocorrência de agregação em maior extensão. Essa instabilidade foi também visível pela perda da intensidade da cor. Verifica-se que, a pH=5, as partículas incubadas com CALNN têm uma coloração menos intensa (quase incolor) que a mesma solução de NSs com PVP, indicando que as nanopartículas se encontram pelo menos parcialmente agregadas. Essa agregação pode indicar que possivelmente ocorreu uma troca, pelo menos parcial do agente de revestimento. Os resultados obtidos para a variação do potencial zeta apresentam-se na figura 40.

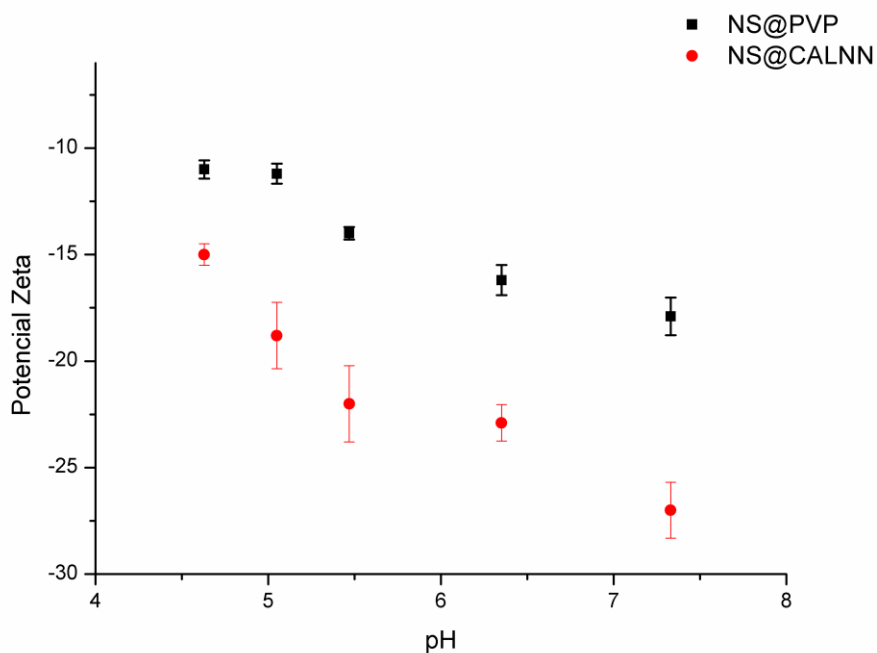


Figura 40. Gráfico com a o potencial zeta das NPs com PVP e CALNN ao diferente pH (3-7).

O potencial zeta das NPs com PVP diminui ligeiramente com o aumento do pH como se verifica anteriormente. Em relação as NPs com CALNN ocorre uma diminuição mais significativa como anteriormente. Na figura 41 apresentam-se as distribuições do potencial zeta das NS@PVP e NS@CALNN, estas medições foram realizadas à pH=7.

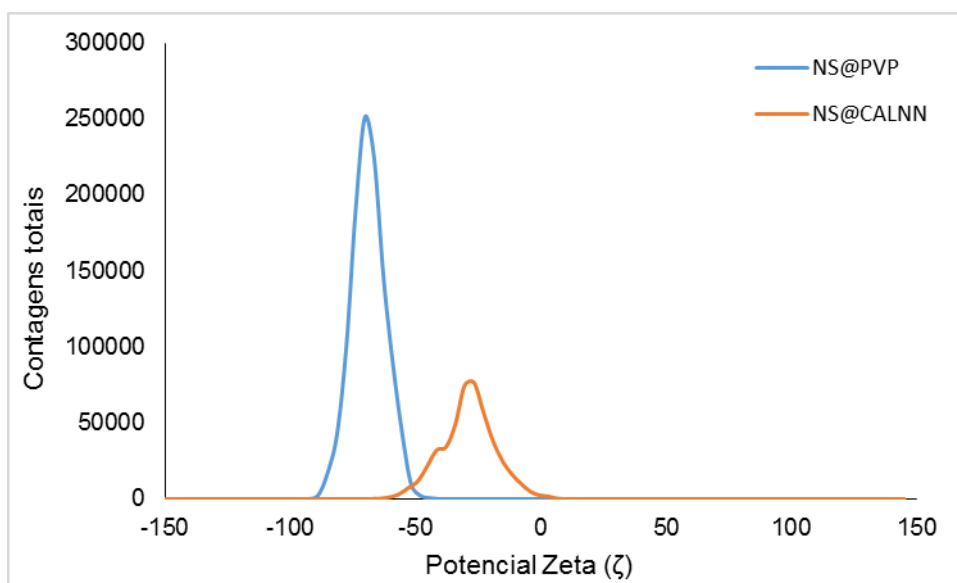


Figura 41. Distribuição do potencial zeta das NS@PVP e NS@CALNN ao pH 7.

Dado que os resultados anteriores, embora indiquem que possa ter ocorrido a adsorção de CALNN, não permitem concluir se o péptido sofre quimiossorção direta à superfície de ouro ou se fica adsorvido fracamente à camada de PVP, recorreu-se à técnica de espectroscopia fotoelectrónica com excitação por raios X (XPS, X-ray photoelectron spectroscopy). Esta técnica poderia permitir distinguir entre estes dois possíveis casos, dado que o sinal correspondente ao enxofre com uma ligação Au-S-(R), com uma estrutura parecida com CALNN ligado ao ouro, encontra-se entre 162,10 - 162,20 eV, enquanto para H-S-(R) (CALNN não ligado diretamente ao ouro) encontra-se entre 163,60 - 164,0 eV, sendo a diferença entre estas energias suficiente para uma boa análise.⁷²

Na figura 42 apresentam-se os espectros obtidos para Au (4f), N (1s) e S (2p).

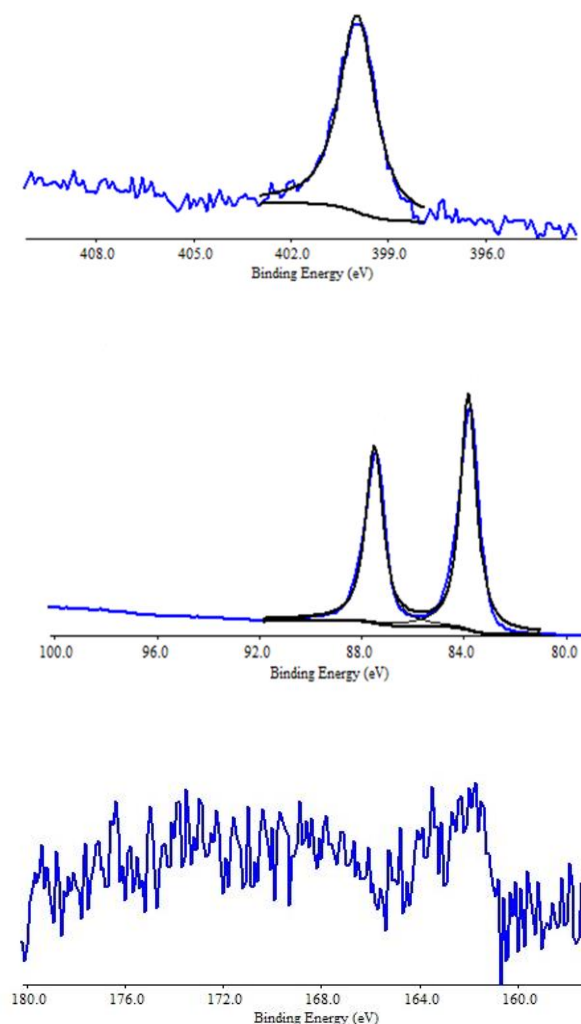


Figura 42. Espectros do elemento Au (4f) no meio, N (1s) em cima e S (2p) em baixo, em que a linha a preto representa o espectro ajustado enquanto o azul apresenta os espectros obtidos a partir da análise de XPS.

A tabela 10 apresenta as energias de ligação dos diferentes picos, bem como a área de cada pico.

Tabela 10. Valores dos picos do espectro do Au, C e N com a respetivo ajuste.

Elemento	Orbital	Picos	Posição (eV)	Área	FWHM (eV)	GL(%)
N	1s	A	399,957	1067,065	1,32	80
Au	4f	B	87,487	10583,45	0,836	80
	4f	C	83,807	12707,6	0,753	80

Verificou-se a presença de um sinal duplete a 87,4 eV e 83,8 eV que pode ser atribuído às orbitais 4f de Au (0) confirmando que as nanopartículas se encontravam depositadas. Apesar de se ter detectado um sinal forte para o carbono este sinal não foi aqui apresentado visto corresponder ao sinal da base de carbono onde as NPs foram depositadas não tendo assim relevância para a análise. Relativamente aos elementos relevantes para a funcionalização que seriam o N e S verificou-se apenas um sinal a 399,9 eV que pode ser atribuído à orbital 1s do N, não sendo possível identificar na zona correspondente ao enxofre um sinal claro que prove a sua existência na amostra e muito menos permita a análise do seu estado de oxidação e ligações químicas. Tendo em conta que tanto o CALNN como o PVP apresentam na sua composição azoto, o sinal identificado por esta técnica para este elemento não nos permite concluir sobre o sucesso da funcionalização. Dado que também não se detetou qualquer sinal para o enxofre, não foi possível confirmar a funcionalização das partículas com CALNN por esta técnica.

Analisando o conjunto de resultados obtidos não é possível concluir com certeza se a troca de agente de revestimento foi completa, mas os resultados dos estudos de agregação por variação do pH e de variação de potencial zeta com o pH indicam que ocorreu pelo menos funcionalização parcial com o pentapéptido CALNN.

5.1.2 Funcionalização das AuNS@PVP com ácido 11-mercaptoundecanoico (MUA) por incubação a temperatura elevada.

Dado que não foi possível provar inequivocamente que tinha ocorrido funcionalização com CALNN, tentou-se um outro método, desta vez usando como agente de revestimento ácido 11-mercaptoundecanoico (MUA, figura 43). O MUA é um agente de revestimento significativamente menos dispendioso que o CALNN permitindo

assim a utilização de excessos molares significativamente maiores do que os que foram tentados com o CALNN. Dessa forma este composto poderia ser usado como modelo para testar vários métodos para a funcionalização até que um método adequado fosse encontrado.

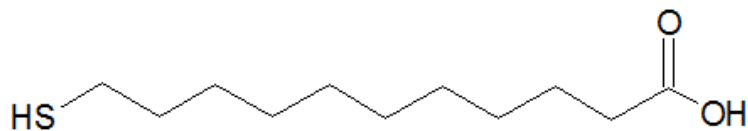


Figura 43. Estrutura molecular do ácido 11-mercaptoundecanoico (MUA).

Na figura 44 apresenta-se um esquema da nova metodologia usada.

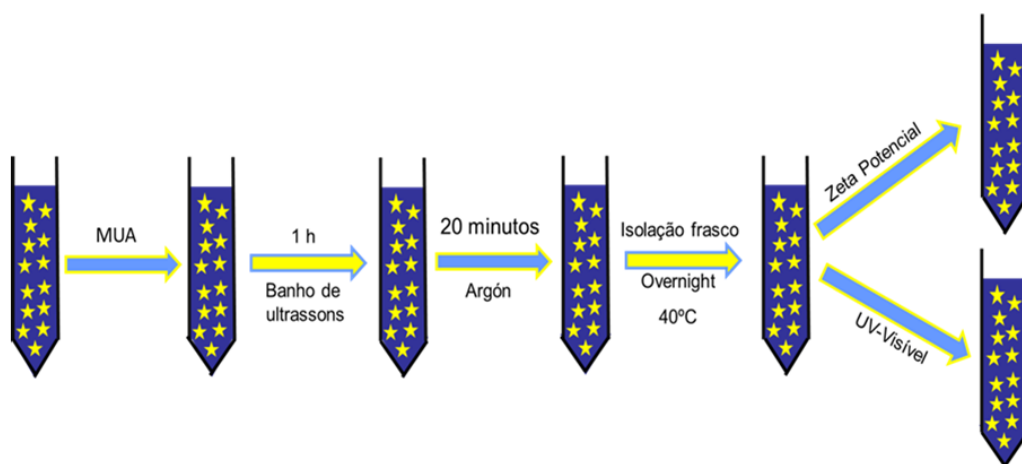


Figura 44. Esquema do método B para a funcionalização das NS@PVP com o agente de revestimento MUA.

Como se pode verificar, neste método a incubação com o novo agente de revestimento é feita a temperatura elevada. Este aumento de temperatura permite promover a dessorção do PVP e assim facilitar a troca de ligandos à superfície da NP. É utilizada atmosfera inerte durante a incubação de maneira a garantir que o grupo tiol do MUA não sofre oxidação durante a incubação impossibilitando assim a funcionalização das NPs. Primeiramente começou-se por avaliar a estabilidade coloidal das AuNS@PVP a 40 °C durante a noite através da comparação dos espectros de UV/Vis antes e após a incubação, de forma a assegurar que a utilização da temperatura não iria provocar alterações morfológicas nas NPs. Dado que não se verificaram alterações significativas, repetiu-se o procedimento adicionando uma solução etanólica de MUA, usando excessos molares de 2X e 5X, as mesmas quantidades utilizadas para a funcionalização com CALNN. Na figura 45 apresentam-se os espectros de UV/Vis das AuNS@PVP antes e depois do banho a 40 °C em atmosfera de árgon. Como se pode

verificar os espectros são idênticos mas ocorre um aumento da absorvância das bandas plasmónicas e um ligeiro desvio do máximo da banda para comprimentos de onda maiores (cerca de 7 nm). Estas diferenças poderão ser devidas à troca de agente de revestimento e consequente mudança do índice de refração da vizinhança da superfície metálica.

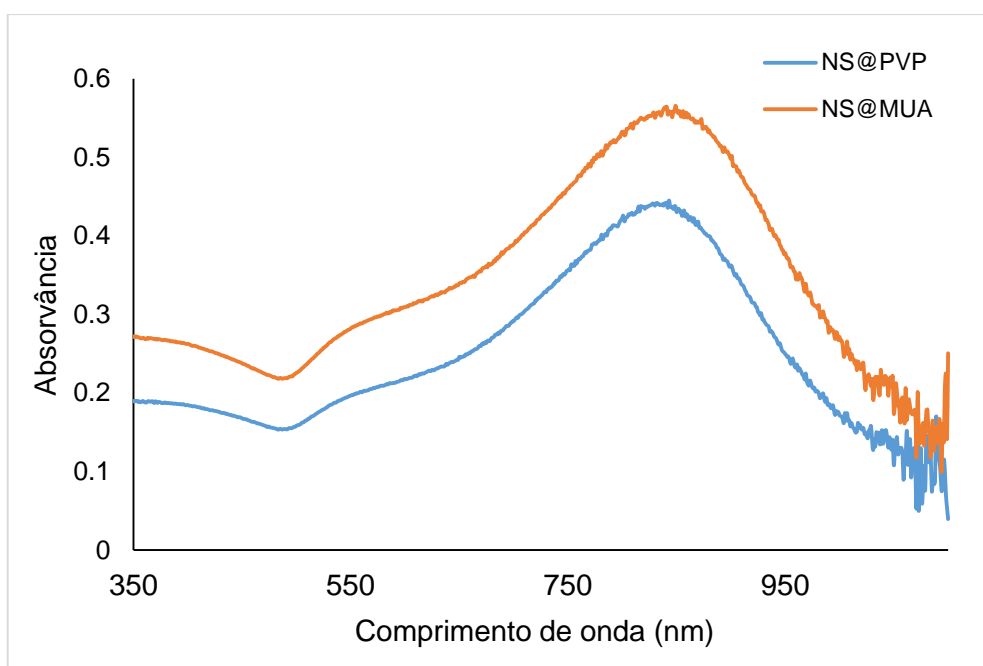


Figura 45. Espectros das NSs com MUA e PVP após tratamento com ultrassons, árgon e incubação a 40 °C durante a noite.

Repetiu-se o procedimento usando excessos molares consideravelmente maiores desde 5 X até 50 X de MUA para avaliar qual seria o excesso molar ideal para uma troca de agente de revestimento completa. No final do procedimento mediu-se o potencial zeta das amostras efetuando-se primeiramente um ajuste do pH para 7 de maneira a garantir medições de potencial zeta comparáveis. Os resultados obtidos encontram-se expostos na figura 46.

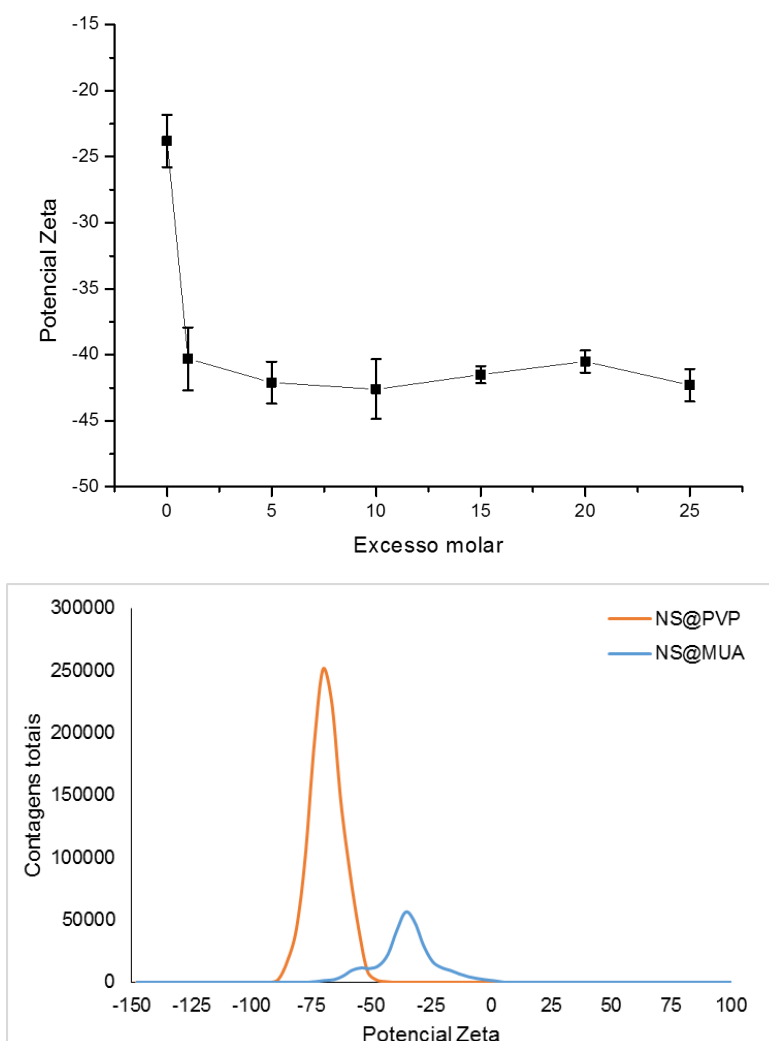


Figura 46. Variação do potencial zeta para os vários excessos molares (em cima). Distribuição do potencial zeta das soluções coloidais NS@PVP e NS@MUA.

Verifica-se que mesmo para o excesso molar mais baixo estudado ocorre uma diminuição muito significativa (cerca de 20 mV) do potencial zeta indicando que ocorre troca do agente de revestimento. A partir do rácio 10 o potencial zeta é constante indicando que a partir deste as nanopartículas já devem estar saturadas em MUA. Os estudos de potencial zeta foram indicativos da ocorrência de troca de agente de, mas verificou-se que o método apresenta baixa reprodutibilidade e que algum tempo após borbulhar as soluções coloidais com árgon as partículas tendem a perder estabilidade coloidal e apresentarem indícios de precipitação.

5.1.3 Funcionalização das AuNS@PVP com ácido 11-mercaptoundenóico (MUA) por imobilização das partículas em vidro.

Devido à impossibilidade de provar uma funcionalização efetiva ou obter partículas estáveis, experimentou-se mais um método desta vez baseado na troca de ligandos de NPs previamente imobilizadas. Este método baseia-se na maior facilidade de troca de ligandos para NPs imobilizadas possibilitando a utilização de condições mais agressivas que caso aplicadas as partículas em solução poderiam levar à sua agregação. Na figura 47 apresenta-se um esquema deste processo.

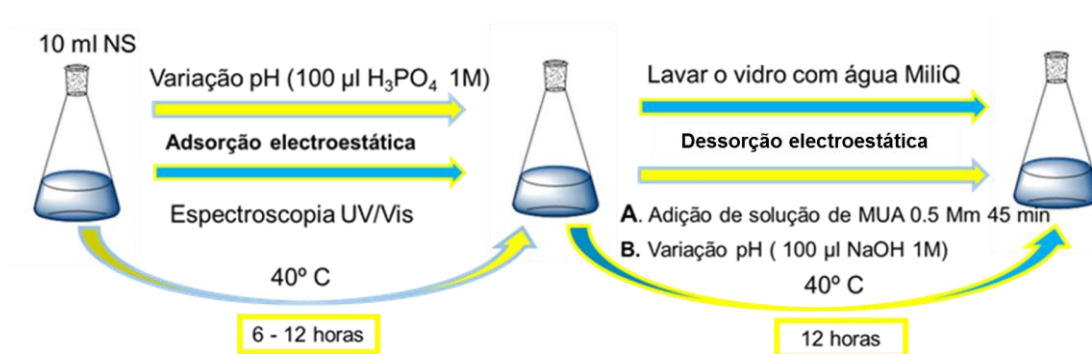


Figura 47. Procedimento da funcionalização das NSs com MUA pelo método de imobilização de partículas no vidro.

Resumidamente, acidificaram-se as soluções coloidais das NSs de forma a favorecer a adsorção electrostática das partículas à superfície do vidro. Como se verifica nas medições de potencial zeta apresentadas na figura 46, as AuNS@PVP apresentam um potencial zeta negativo até cerca de pH 3. Os grupos hidroxilos superficiais do vidro possuem um equilíbrio ácido-base que leva a uma distribuição de cargas que vai tendendo para uma predominância de cargas positivas para pH mais baixos. Este facto leva assim a uma adsorção destas NPs a pH mais baixos. Utilizou-se ácido fosfórico de maneira a evitar a utilização de ácidos possuindo iões halogenetos (como HCl) que podem promover alterações da morfologia das partículas, assim como ácidos fortemente oxidantes (como HNO_3).

Acompanhou-se o processo de adsorção por espectroscopia UV/Vis do sobrenadante para avaliar a presença de nanopartículas em solução. Na figura 48 apresentam-se os espectros do sobrenadante no decorrer do processo de adsorção das partículas ao vidro.

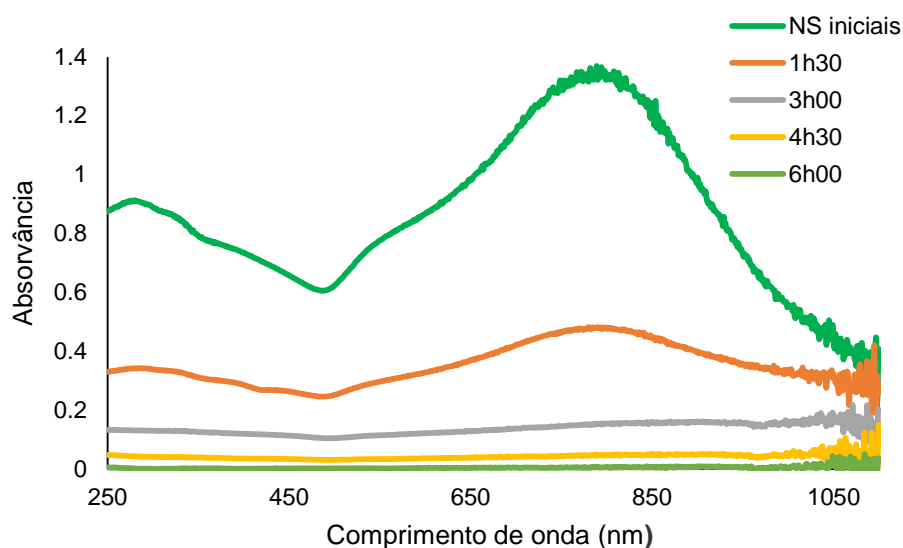


Figura 48. Espectros do sobrenadante das NSs durante o processo de adsorção das partículas.

Verificou-se que na primeira hora e meia após a adição de ácido fosfórico ocorre uma forte diminuição da intensidade das bandas plasmónicas (cerca de 75%), mas são necessárias cerca de 6 horas para que a absorvância seja nula, indicando adsorção completa. Na figura 49 apresentam-se as fotos das NPs adsorvidas à superfície do vidro.



Figura 49 Imagem das AuNSs iniciais (esquerda) e adsorvidas ao vidro (direita).

Na segunda fase deste método adicionou-se uma solução de MUA e deixou-se num banho a 40 °C de maneira a promover a troca de ligandos. Posteriormente adicionou-se NaOH (em quantidade idêntica à do ácido adicionado) de maneira a promover a redispersão completa das NPs. Esta redispersão é possível por causa da troca de agente de revestimento visto que o MUA possui um grupo ácido carboxílico que sofre desprotonação por adição de NaOH, adquirindo assim carga negativa e levando à sua dessorção da superfície do vidro. Na figura 50 apresentam-se os espectros referentes às nanopartículas originais e após o tratamento. Neste caso as nanopartículas foram lavadas por centrifugação e ressuspensão num volume de solução idêntico ao original.

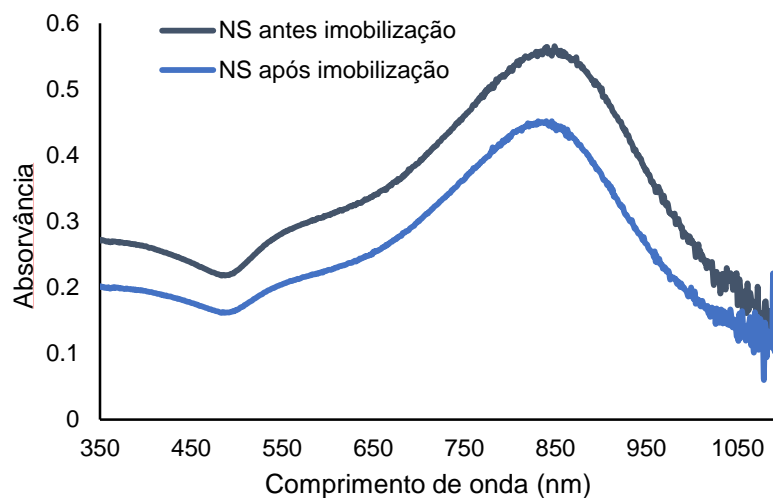


Figura 50. Espectros da NSs antes (preto) e depois (azul) do processo de funcionalização com MUA.

Comparando-se os espectros antes e depois da imobilização, verifica-se que existe apenas um ligeiro desvio dos máximos de absorção das bandas plasmónicas (cerca de 6 nm), indicando que não ocorre alteração significativa da morfologia das NPs. Ocorre uma ligeira diminuição (cerca de 25%) da intensidade das bandas, possivelmente devido às perdas de nanopartículas inerentes ao processo de adsorção/dessorção e lavagem por centrifugação/ressuspensão.

Para comprovar a troca de agente de revestimento recorreu-se ao potencial zeta. Na figura 51 apresentam-se os gráficos da distribuição de potencial zeta para as AuNS@PVP originais e após tratamento, estas medições foram realizadas a pH 7.

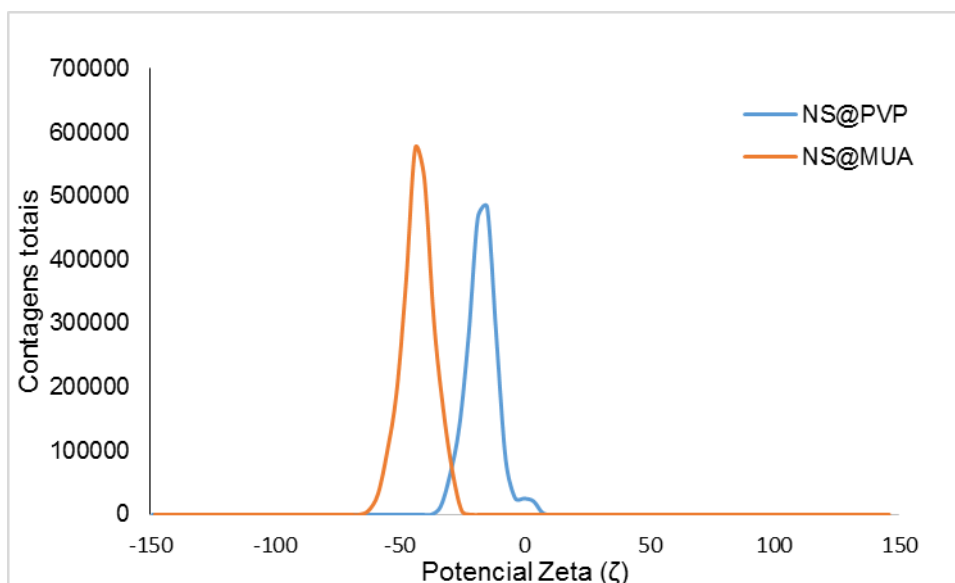


Figura 51. Distribuição do potencial zeta para das AuNS@PVP e AuNS@MUA.

Como se pode verificar tanto as NS@PVP como NS@MUA apresentam uma distribuição de potencial zeta bastante estreita, indicativa da homogeneidade de ambas as amostras. Os valores obtidos foram $-16,3 \pm 1,1$ mV para NS@PVP e $-48,9 \pm 1,5$ mV para as nanopartículas após tratamento, indicando que ocorreu pelo menos troca parcial do PVP por MUA. Estes resultados podem ser comparados com os obtidos no método anterior pois foram realizados nas mesmas condições. A variação do potencial zeta nestes 2 métodos são muito próximos indicando uma possível troca de agente de revestimento. Em contra partida o método da imobilização tem mais viabilidade devido a um reduzido grau de agregação do que para o método por incubação a temperatura elevada.

5.2 Funcionalização de nanoestrelas de ouro (AuNS@Citrato) com MUA.

Tal como verificado na secção 4.3 do capítulo anterior estas NPs apresentam um problema de estabilidade após a síntese, verificando-se alterações de morfologia e também dificuldades na purificação das NPs por centrifugação que leva frequentemente à sua agregação. Desta forma decidiu-se efetuar a sua funcionalização imediatamente após a síntese, ainda antes de se proceder à primeira centrifugação para lavagem. Sendo estas NPs revestidas por citrato, um agente de revestimento consideravelmente

lável, não existem razões para esperar grandes dificuldades de substituição do agente de revestimento, tais como para as NS revestidas por PVP, sendo que para a sua funcionalização adotou-se um procedimento de adição simples do agente de revestimento desejado. Outra razão para a adição imediata do agente de revestimento prende-se com a necessidade de estabilizar as NPs através de uma molécula que crie ligação mais forte à NP (como por um grupo tiol). Além de conferir estabilidade coloidal poderia impedir fenómenos de alteração de morfologia ao passivar a superfície da NP. De maneira análoga às funcionalizações anteriores foi calculada a quantidade necessária de MUA para a formação de uma monocamada completa à superfície das NSs utilizando os diâmetros obtidos por TEM. A única alteração prendeu-se com a impossibilidade de obter uma concentração por NTA (as NPs não funcionalizadas não eram estáveis o suficiente para poderem ser transportadas até ao lugar onde a análise foi efetuada) tendo-se utilizado uma concentração estimada através do número de *seeds* utilizadas na síntese (cálculo análogo ao apresentado na secção 4.2). Foram testados excessos molares de 1X, 10X e 100X de MUA.

Na figura 52, apresentam-se os espectros das NSs antes e depois da funcionalização com diferentes excessos molares de MUA.

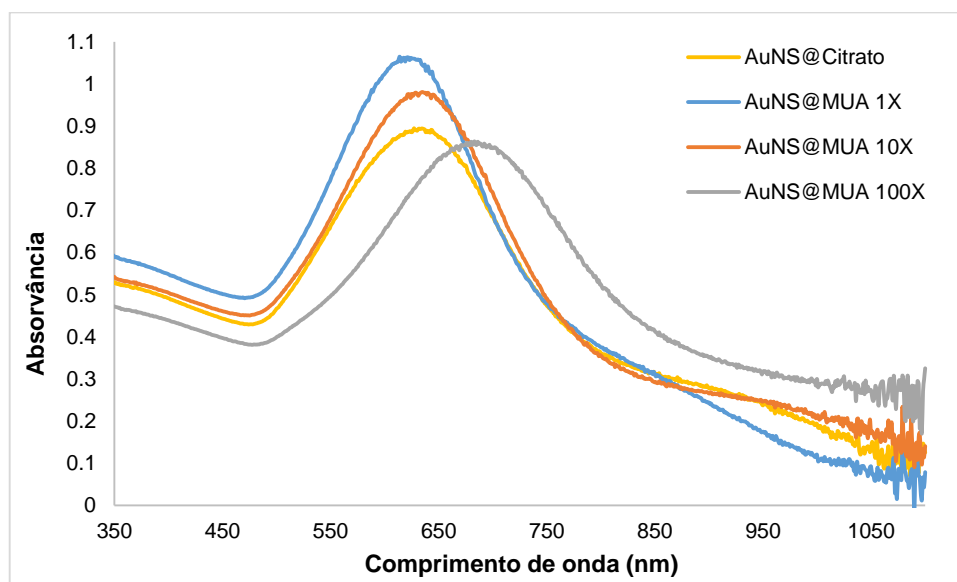


Figura 52. Espectros das AuNSs com as várias razões de excesso molar entre NSs e MUA comparando com as AuNS@Citrato.

Verifica-se que para um excesso molar de 10X existe um menor desvio das bandas e máximos de absorção em relação as partículas após a síntese, contendo citrato o que dessa forma indica uma maior estabilidade coloidal.

Na tabela 11 apresentam-se as medições de potencial zeta das soluções de NSs com os vários excessos molares NSs/MUA e a NSs com citrato (originais).

Tabela 11. Valores de potencial zeta das NSs funcionalizadas com os vários excessos molares de MUA comparativamente com as nanoestrelas com citrato.

Soluções	pH	Potencial Zeta (ζ)
AuNS@Citrato	7,32	-21,7 \pm 0,8
AuNS@MUA 1x	7,26	-36,6 \pm 0,1
AuNS@MUA 10x	7,28	-34,4 \pm 0,5
AuNS@MUA 100x	7,25	-40,4 \pm 2,2

Em relação ao potencial zeta as partículas com citrato apresentam menor potencial (\approx -22 mV) enquanto que as funcionalizadas com MUA apresentam potências mais negativos entre os -34 mV e os -40 mV, sendo que todas as amostras foram medidas a um pH a volta de 7. Esta alteração da carga superficial das partículas indica a possibilidade de ter ocorrido uma funcionalização com sucesso.

De forma a provar a ocorrência de funcionalização desta NPs foram efetuados ensaios de agregação das NPs com sal. Este tipo de procedimento permite utilizar diferenças na estabilidade coloidal das NPs na presença de força iónica elevada para permitir concluir se ocorreu uma troca de ligandos superficiais que consiga impactar significativamente na sua estabilidade. A troca de um agente de revestimento lábil como o citrato por uma molécula tiolada deverá em princípio impactar significativamente a estabilidade coloidal destas NPs. Embora este tipo de testes seja tipicamente efetuada utilizando NaCl, escolheu-se usar um sal que não possuísse qualquer ião halogeneto de maneira a evitar alterações morfológicas destas NPs que iram complicar significativamente a análise dos resultados. Dessa maneira escolheu-se utilizar o nitrato de potássio (KNO₃).

Prepararam-se várias amostras de NPs contendo concentrações crescentes do sal, tal como indicado na tabela 12.

Tabela 12. Tabela com a composição das soluções coloidais usadas para o estudo de agregação com sal, KNO_3 .

Solução	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Concentração de sal mM	800	600	400	200	100	80	60	40	10
Volume NS (μl)	200	200	200	200	200	200	200	200	200
Volume KNO_3 (μl)	800	600	400	200	100	80	60	40	10
Volume H_2O (μl)	0	200	400	600	700	720	740	760	790
Volume final (μl)	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000

Utilizou-se o mesmo lote de NPs que foi dividido em dois sendo uma metade funcionalizada com MUA (utilizando um excesso molar de 10X – determinado anteriormente como sendo a proporção que permite uma melhor estabilidade) e outra não funcionalizada. Os testes foram elaborados imediatamente para evitar alterações morfológicas.

A estabilidade coloidal destas misturas foi avaliada através de espectroscopia de UV/Vis após um período fixo de tempo, 30 minutos, para todas as amostras, encontrando-se os resultados obtidos na figura 53.

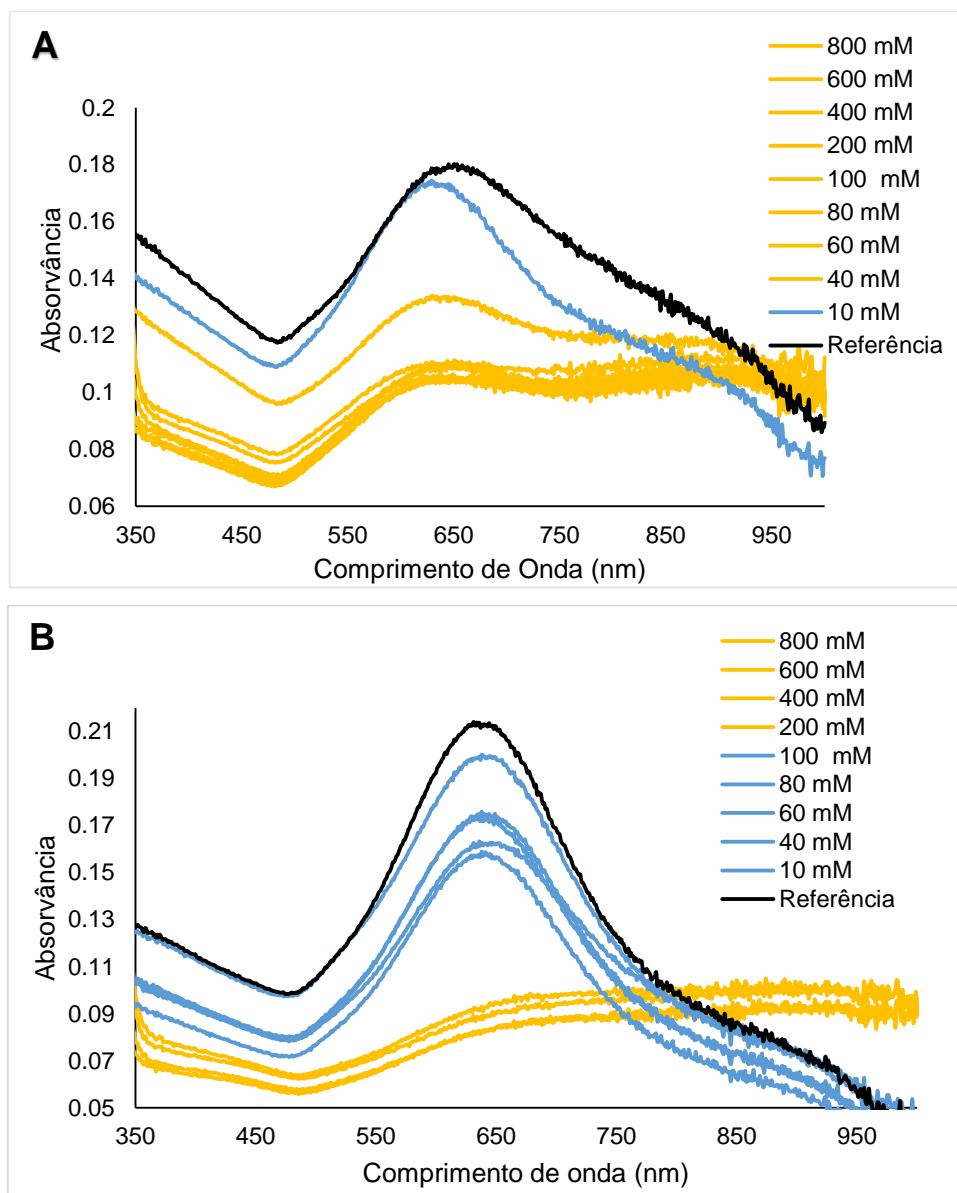


Figura 53. Espectros que demonstram a evolução da estabilidade da dispersão coloidal das AuNS@Citrato (A) e AuNS@MUA (B) na presença do nitrato de potássio a diferentes concentrações.

Neste conjunto de espectros é possível identificar casos de agregação através do desvio significativo da banda plasmónica e da diminuição da sua intensidade, estando estes casos assinalados na figura 53 a amarelo. No primeiro conjunto de espectros, referentes às NS com citrato, verifica-se que ocorre uma agregação significativa para concentrações de sal superiores a 10 mM. Já para as NPs funcionalizadas com MUA, a agregação apenas começa a ocorrer acima de concentrações de 100 mM de sal, revelando assim uma muito maior estabilidade coloidal.

As nanopartículas de citrato apresentam o anião citrato ligado electrostaticamente às NSs e com a adição de um sal à solução coloidal, ocorre um

efeito de blindagem das cargas induzidas pelo eletrólito proveniente do sal, provocando o enfraquecimento das repulsões electrostáticas entre partículas provocando a agregação destas. A labilidade do citrato também tem um papel importante na maior sensibilidade destas NPs à força iónica. Em relação as NPs com MUA isto acontece em menor extensão, pois esta molécula encontra-se ligada mais fortemente à partícula tornando mais difícil perturbar a sua estabilidade coloidal comparando com as NPs com citrato.

Além dos espectros também é possível verificar a agregação das nanopartículas pela alteração da sua coloração (figura 54) sendo possível assim confirmar visualmente os resultados de UV/Vis apresentados anteriormente.

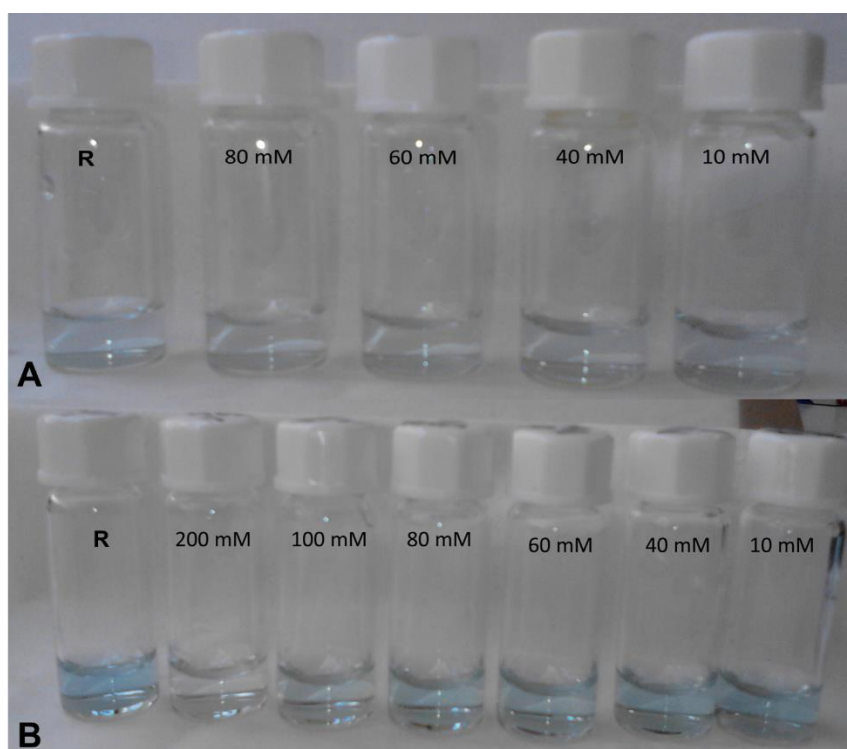


Figura 54. Alteração da coloração das soluções coloidais de AuNS@Citrato (A) e AuNS@MUA (B) com as diferentes concentrações de KNO_3

Tendo em conta os resultados apresentado pelo teste da estabilidade das partículas com KNO_3 verifica-se que as partículas encontram-se funcionalizadas.

Para verificar se as NSs com MUA, utilizando um excesso molar de 10X, se mantem estáveis ao longo do tempo (24 h) analisou-se periodicamente a mesma solução de nanopartículas funcionalizada por espectroscopia UV-Visível. Foram também efetuadas o mesmo tipo de medições para as NSs não funcionalizadas. Estes espectros encontram-se apresentados na figura 55.

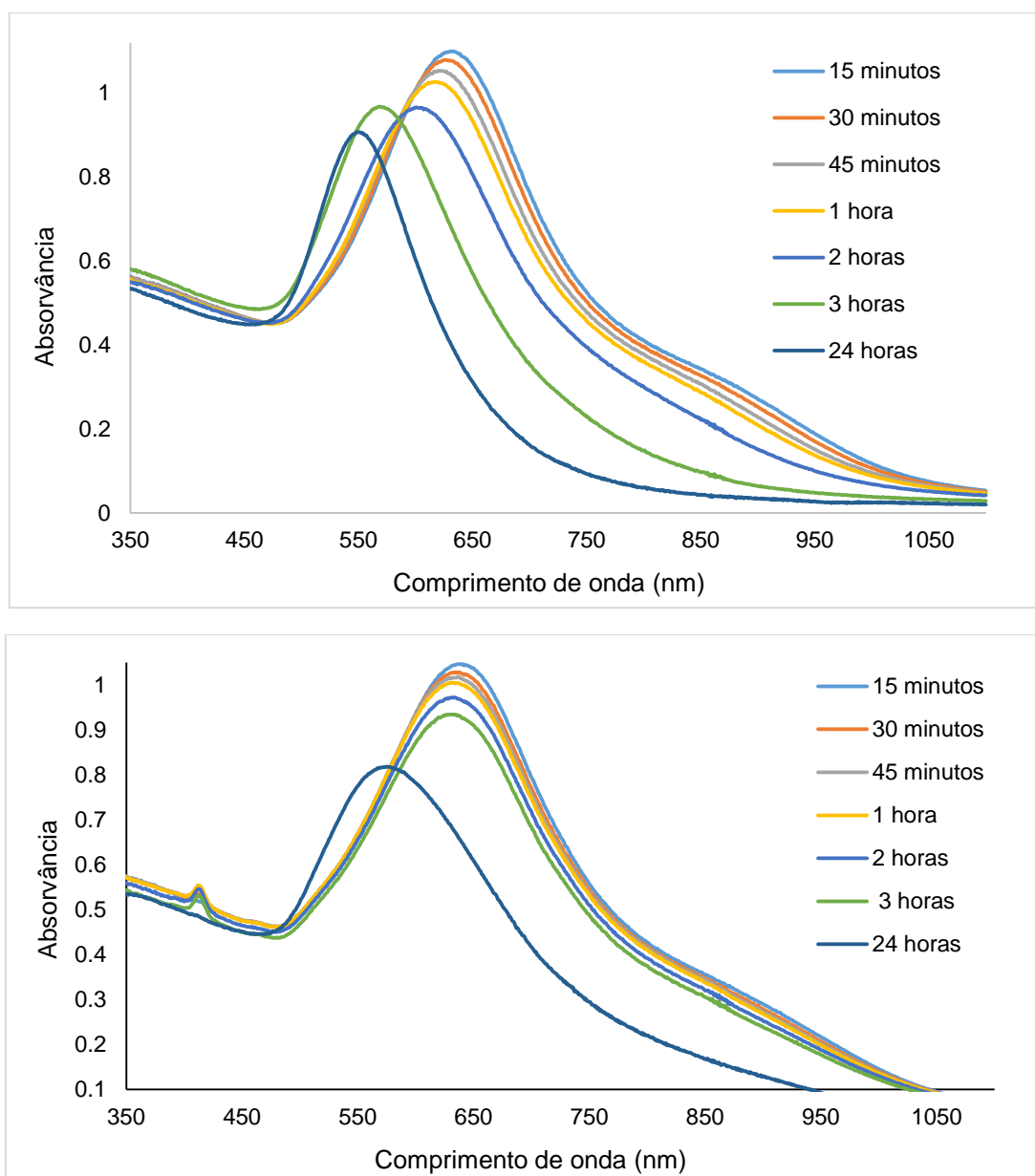


Figura 55. Evolução dos espectros das AuNS@citrato (em cima) e das AuNS@MUA 10X (em baixo) funcionalizadas com MUA, durante 24 horas.

Esta experiência teve como objetivo verificar por UV/Vis se a funcionalização das NPs com MUA permitiu resolver o seu problema de estabilidade ao longo do tempo e possíveis alterações de morfologia.

Verifica-se que para as NSs com MUA, nas primeiras 3 horas existe uma elevada estabilidade, uma vez que não ocorrem alterações significativas das bandas plasmónicas, tanto na forma destas como para os seus máximos de absorção. Já para o caso das partículas não funcionalizadas verifica-se logo desde a primeira hora um desvio da banda para menores comprimentos de onda indicando uma possível alteração

da morfologia, possivelmente redissolução das suas pontas. Em relação aos espectros referentes às 24 h, verifica-se que tanto as NPs com MUA como as não funcionalizadas apresentam um desvio da banda para comprimentos de onda menores. No entanto para as NPs com MUA verifica-se um desvio da banda muito menos significativo permitindo concluir que embora a funcionalização das NPs com MUA não trave completamente o processo de alteração da morfologia, consegue no entanto atrasá-lo significativamente. Na figura 56 podem-se verificar fotos das dispersões coloidais das NPs usadas neste ensaio tanto ao tempo 0 como ao fim de 24 h.

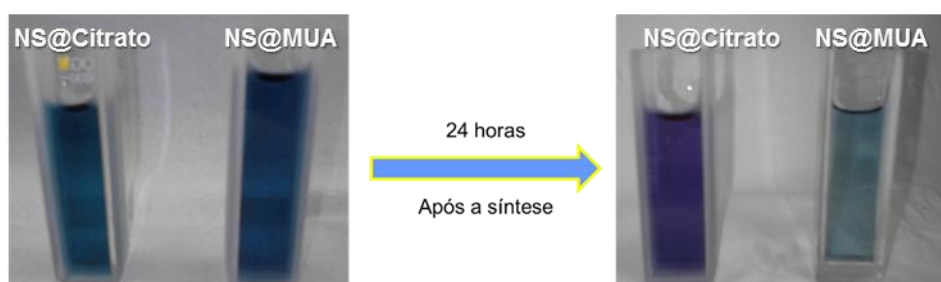


Figura 56. Variação da coloração das soluções coloidais (com MUA e citrato) após a síntese e 24 horas depois.

Como se pode observar após 24 h as NPs com MUA apresentam uma coloração muito próxima das nanopartículas com citrato após a síntese indicando que elas continuam relativamente estáveis 24 horas depois.

Capítulo 6 – Bionanoconjugados de NS e proteína tirosinase

Neste capítulo apresentam-se os resultados relativos à formação de bionanoconjugados (BNC) com a enzima tirosinase. Foram selecionados para esta conjugação as AuNS sintetizadas pelo método de Liz-Márzan (revestidas com PVP e revestidas com MUA) e também as NSs produzidas pelo método de Vo Dinh funcionalizadas com MUA.

Primeiramente fez-se uma estimativa do número de moléculas de proteína necessária para a formação de uma monocamada uniforme. Para esse cálculo foi necessário determinar o volume aproximado de uma molécula de tirosinase. Usaram-se os dados estruturais desta proteína determinados por cristalografia de raios-X disponíveis no Protein Data Bank⁶⁸ e utilizou-se o *software* VMD para visualizar a estrutura e efetuar medições encontrando-se estas representadas na figura 57.^{72 73}

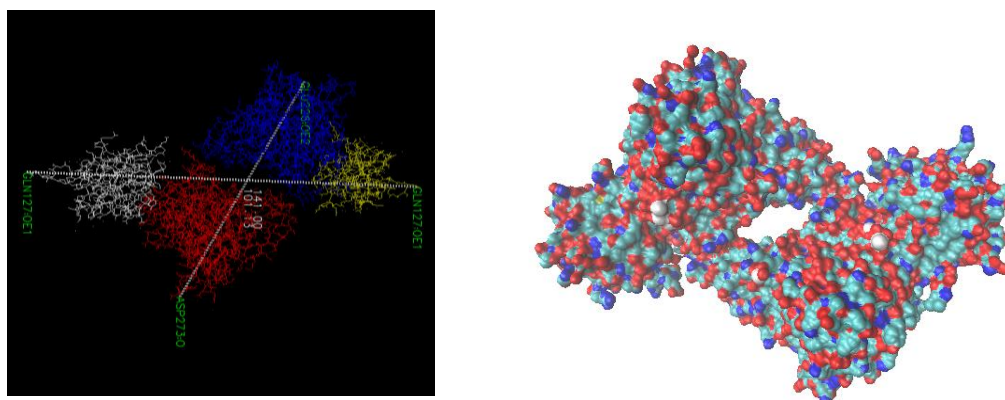


Figura 57. Imagem retirada do programa VMD da proteína tirosinase (ficheiro pdb 2Y9W) em que mede a distância máxima das extremidades da proteína (esquerda) e a estrutura volumosa da tirosina de forma a identificar a sua forma aproximada (direita).⁷⁴

Utilizando este programa determinaram-se as dimensões da proteína utilizando as diagonais maiores e menor como medidas, visto esta proteína apresentar um formato oval. Foi efetuada uma medição entre o resíduo GLU226 da cadeia A e o resíduo ASP273 da cadeia B sendo a distância obtida de cerca 101.1 Å equivalente a 10.11 nm. A segunda medição foi efetuada entre o resíduo GLN127 da cadeia D e o resíduo GLN127 da cadeia C obtendo-se uma distância de 141.0 Å equivalente a 14.1 nm. Para a estimativa do volume considerou-se que a tirosinase como uma esfera perfeita e

utilizou-se o diâmetro maior de 14.1 nm. Tal cálculo por excesso foi feito para corrigir os efeitos das diferentes possibilidades de orientação da proteína em redor da NP, assim como um empacotamento menos compacto da proteína. Determinou-se o volume da coroa esférica da monocamada de tirosinase por subtração do volume médio das nanopartículas (dados de TEM) ao volume total do conjugado, calculado considerando diâmetro correspondente à soma do diâmetro das partículas com o dobro do diâmetro da proteína (114 nm). Para o cálculo do número de moléculas de proteína dividiu-se o volume da coroa da proteína pelo volume de uma molécula de proteína, tendo-se obtido um valor de cerca de 300 proteínas por NP. Este número deve ser uma estimativa por excesso, dado que as aproximações geométricas consideradas no cálculo tendem a estimar por excesso o tamanho da partícula e por consequência o número de proteínas requeridas para a saturação. Dessa forma utilizaram-se nos estudos rácios molares de 50 e 200.

Na figura 58 apresentam-se os dados do potencial zeta para AuNS@PVP e AuNS@MUA (provenientes da síntese com PVP) e os respetivos BNCs com uma razão molar de NP/proteína de 1:50 e variação de pH na gama de 5 a 8. Este tipo de experiência permite distinguir a formação de bionanoconjugados através do diferente perfil de alteração do potencial zeta com o pH. Esta alteração do perfil deve-se à presença da proteína que com os diversos grupos protonáveis presentes nas cadeias laterais dos aminoácidos deverá ter um perfil distinto de variação de carga superficial com o pH.

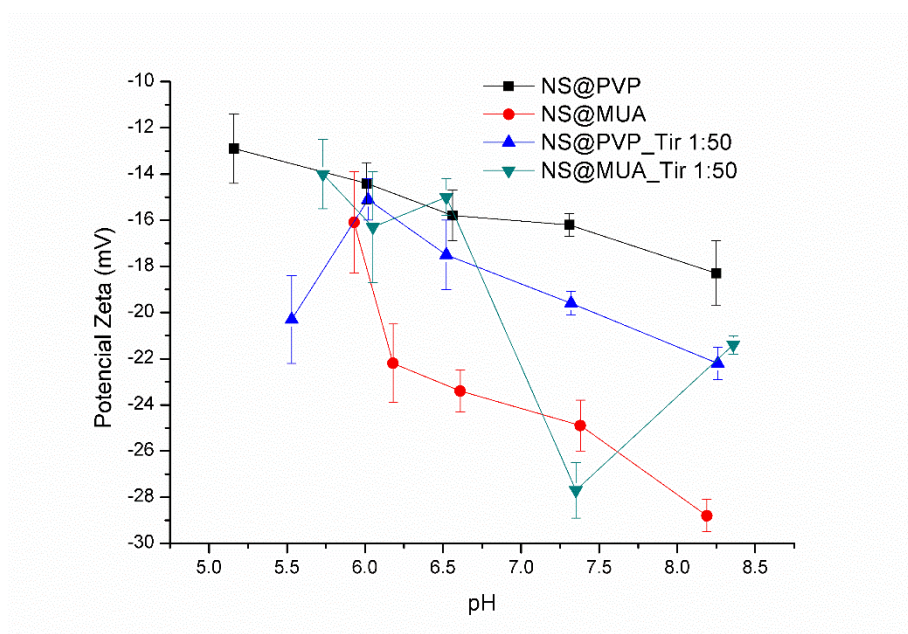


Figura 58. Variação do potencial zeta com o pH de AuNS@PVP e AuNS@MUA (método de Liz Márzan) e para os respetivos bionanoconjugados com rácio molar de 50 de tirosinase por NP.

Na figura 58 observa-se uma variação do potencial zeta muito irregular com o aumento do pH para os bionanoconjugados, tanto utilizando partículas revestidas com PVP como com MUA. Este comportamento pode dever-se a um revestimento incompleto das NPs com a proteína ou/e uma distribuição não uniforme de tirosinase nas NPs. Isto pode indicar que uma razão de 50 não é suficiente para formar uma monocamada uniforme de proteína à volta das NPs.

Já as partículas na ausência de proteína apresentam um comportamento mais regular em termos da sua variação de potencial zeta com o pH. Verifica-se que para partículas revestidas com PVP ocorre uma variação ligeira da carga superficial das partículas com o aumento do pH. Este comportamento é o esperado tendo em conta que o PVP não altera o seu estado de protonação com o aumento do pH. Já para as NPs revestidas com MUA ocorre uma diminuição mais significativa do potencial zeta com o aumento do pH devido à desprotonação do grupo ácido carboxílico do MUA.

Na figura 59 apresentam-se os dados de uma experiência idêntica para bionanoconjugados com razão molar de 200.

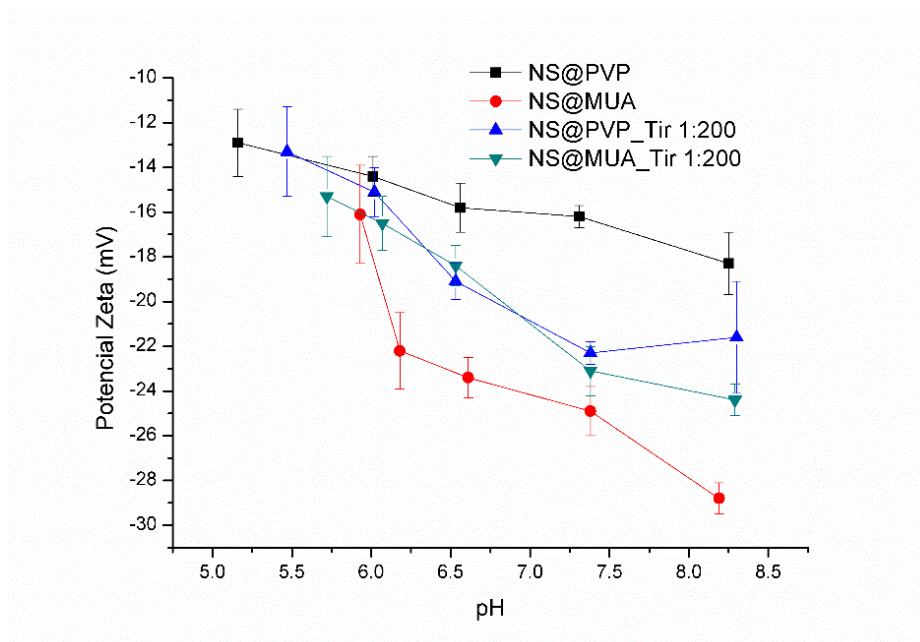


Figura 59. Variação do potencial zeta com o aumento do pH de AuNS@PVP e AuNS@MUA (obtidas pelo método de Liz-Márzan) e para os respetivos bionanoconjugados com rácio molar de 200 de tirosinase por NP.

Observando a figura 59 é possível verificar para ambos os bioconjugados (tanto construídos com NS com PVP ou com MUA) uma evolução semelhante de potencial zeta com o pH. O comportamento dos bionanoconjugados diferencia-se assim do apresentado pelas partículas com apenas MUA e PVP indicando uma distribuição de

cargas superficiais diferente e assim a adsorção com sucesso de proteína. Isto pode indicar que esta razão é suficiente para a formação de uma monocamada de proteína à volta da NP, não sendo necessário utilizar razões superiores. Tendo em conta estes resultados pode-se afirmar que foi possível a construção de bionanoconjugados utilizando as NSs revestidas com PVP e MUA obtidas através da síntese de Liz-Márzan.

Seguindo a mesma metodologia utilizaram-se agora as NS produzidas pelo método de Vo Dinh para a formação de BNCs. Uma vez que estas apresentavam problemas de estabilidade (discutidos na secção 5.3) foram apenas utilizadas as NPs funcionalizadas com MUA e mesmo assim apenas recentemente sintetizadas. Para a formação dos bionanoconjugados usou-se mais uma vez razões molares de 50 e 200 de proteína para NP de forma a comparar com os resultados anteriores.

Na figura 60 representa-se a variação do potencial zeta com o aumento do pH dos bionanoconjugados com a razão molar de 50 e 200 comparando com as NS revestidas com MUA.

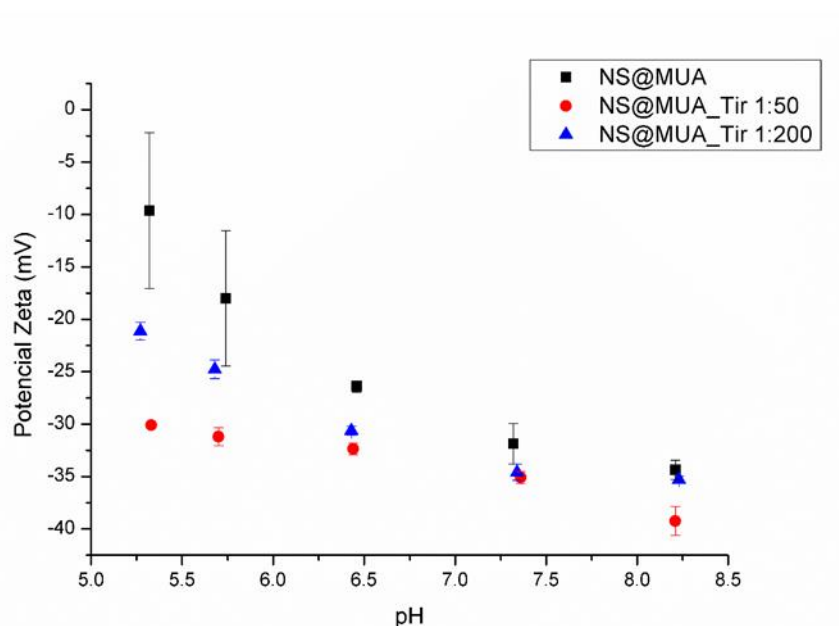


Figura 60. Variação do potencial zeta com o pH de AuNS@MUA (método de Vo Dinh) e para os respetivos bionanoconjugados com rácio molar de 50 e de 200 de tirosinase por NP.

Como se pode verificar na figura 60, os bionanoconjugados apresentam uma variação de potencial zeta com o pH de menor magnitude que o verificado para o controlo (partículas com MUA). Esta diferença de comportamento poderá indicar uma adsorção de proteína nas nanopartículas formando um BNC. Relativamente às duas

razões existem algumas diferenças de comportamento entre estas para as quais não nos é possível apresentar uma possível causa sem efetuar experiências adicionais.

Tendo em conta estes resultados é possível concluir que foi possível efetuar a formação de BNCs utilizando NS funcionalizadas com MUA e PVP utilizando uma razão de proteína/NP de 200. Já para as NSs obtidas a partir do método de Vo Dinh existem indícios da formação de BNCs para NPs funcionalizadas com MUA embora seja necessário efetuar experiências adicionais para confirmar este facto.

Capítulo 7 - Conclusão

7.1 Considerações Finais

No decorrer deste trabalho desenvolveu-se o estudo de síntese, funcionalização de nanopartículas e por fim a formação de bionanoconjugados com as mesmas.

Neste trabalho sintetizaram-se nanopartículas em forma de estrela por dois métodos diferentes (Liz Marzán³⁶ e Vo Dinh³⁷). Verificou-se que após o processo de otimização e funcionalização das nanoestrelas sintetizadas pelo método Liz Marzán³⁶, ocorreu uma alteração (de natureza desconhecida) num reagente (PVP) essencial à síntese destas NPs impossibilitando sínteses futuras por este método. Para contornar este problema inicialmente tentou-se a síntese destas NPs utilizando lotes de PVP diferentes e de outros fornecedores nunca sendo possível a reprodução dos resultados. Deste modo pensou-se noutra metodologia de síntese, o método do Vo Dinh³⁷. Este método foi otimizado e, apesar de apresentar algumas vantagens ao nível da facilidade de funcionalização, verificou-se que a estabilidade da morfologia das partículas era reduzida. Para ultrapassar este problema tentou-se a funcionalização imediata das NPs após a síntese.

Todas as NPs sintetizadas neste trabalho foram funcionalizadas com MUA. As nanoestrelas sintetizadas pelo método de Liz Marzán foram funcionalizadas por 3 métodos diferentes. Este facto foi verificado por potencial zeta devido ao aumento da magnitude da carga superficial das NSs indicando a troca de agente de revestimento (PVP por MUA).

Em relação às NSs sintetizadas segundo o método de Vo Dinh³⁷, verificou-se que o processo de funcionalização como referido anteriormente deveria ser realizado após a síntese. De forma a confirmar a funcionalização destas NPs recorreu-se à medição do potencial zeta e a estudos de agregação das NSs com um sal, KNO₃. Este último permite verificar diferenças significativas da estabilidade das NSs antes e depois do processo de funcionalização após a adição do sal. Em relação aos bionanoconjugados, foram construído com as nanoestrelas sintetizadas pelos 2 métodos (utilizaram-se NPs funcionalidades com MUA e NPs com o agente de revestimento inicial).

Para a formação dos bionanoconjugados recorreu-se ao cálculo aproximado do número de moléculas de proteína que se conseguem alojar à superfície de uma NS. Este cálculo permitiu determinar razões molares de proteína para NP adequadas para estudo. Construíram-se bionanoconjugados com razões molares de 50 e 200 de

proteína para NP. Decidiu-se estudar a variação do potencial zeta destas estruturas com alteração do pH tendo como controlo as nanopartículas sem proteína.

Estes BNCs apresentaram uma variação do potencial zeta (com o aumento do pH) na presença da proteína, distinta da variação apresentada pelo controlo (nanopartículas sem proteína), indicando a possível construção de BNCs. Para a optimização do processo de construção de BNCs poder-se-ia experimentar outras condições experimentais tais como a variação do pH e força iónica. Quando a verificar a formação do BNC, poder-se-ia utilizar outra técnica como a fluorescência para seguir este processo. Apresentando a proteína fluorescência (devido à presença do aminoácidos triptofano e tirosina), é possível a monitorização da adsorção da proteína à NP uma vez que esta será fortemente diminuída quando a proteína e a NP se encontram próximas (na ordem das dezenas de nanómetros).

7.2 Perspetivas futuras

Neste trabalho sintetizaram-se NPs que apresentam forma de estrela. Em relação às nanoestrelas sintetizadas com o método Vo Dinh seria interessante sintetizar um maior volume de solução reacional e encontrar forma de as manter estáveis após a síntese e principalmente após a funcionalização. Para isso poder-se-ia tentar a funcionalização com outros agentes de revestimento e variar suas proporções em relação às NPs. Isto seria vantajoso para a construção de BNCs inibindo possíveis alterações morfológicas das NSs durante o processo de construção destas estruturas.

Em relação aos BNCs seria interessante verificar se após o processo de construção destas estruturas, as proteínas adsorvidas mantêm a sua atividade enzimática. Desta forma, seria possível verificar se ocorre desnaturação, perda da atividade biológica devido a alterações estruturais da proteína durante o processo e alterá-lo de forma a inibir esse fenómeno. Outra possibilidade seria promover a formação de ligações covalentes entre o agente de revestimento das NPs com as proteínas. Isso é possível utilizando por exemplo os reagentes de acoplamento EDC (1-etil-3-(3 dimetilaminopropil)carbodiimida) e NHS de forma a promover a ligação covalente entre aminas e os ácidos carboxílicos. O processo de conjugação covalente teria de ser bem otimizado, pois a formação destas ligações pode dar origem a alterações estruturais das proteínas e consequente perda da atividade.

Estes bionanoconjugados podem possivelmente ser utilizados em elétrodos de forma a detetar fenóis e difenóis. Neste tipo de elétrodos seria interessante conjugar estas estruturas com outros nanomateriais como por exemplo nanotubos de carbono ou

nanofibras de carbono.⁷⁴ Esta conjugação de nanomateriais permitiria aumentar a condutividade elétrica no eletrodo, diminuindo o tempo de resposta e o limite de deteção mas também aumentar o número de análises por intervalo de tempo.⁷⁵

8. Referências

1. Pereira, D. *Síntese e funcionalização de nanocubos de ouro*, **2012**, Faculdade de Ciências da Universidade do Porto.
2. <http://entendendocosmetologia.blogspot.pt/> [citado 23 janeiro].
3. <http://maisunifra.com.br/conteudo/conceitos-basicos-relacionados-a-nanociencia/#5> [citado 23 janeiro].
4. Drexler, K.E., Engines of Creation 2.0, *The Coming Era of Nanotechnology*. **2006**, Wwio.
5. Asuri, P., et al., *The protein-nanomaterial interface*. Current Opinion in Biotechnology., **2006**, 17, 562-568.
6. Theis, T., et al., *Nanotechnology in Nature Nanotechnology*, **2006**, 1, 8-10
7. Claussen, C. Jonathan; Franklin, D. Aaron; Haque, Aeraj; Porterfield, D.Marshall; Fisher, S. Timothy; ACS Nano, **2009** , 3 , 37-44.
8. Tran, P.A., et al., Journal of Materials Chemistry., **2009**,19,2653-2659.
9. Gomes, I., *Interacção de proteínas com superfícies nanoestruturadas e nanopartículas de metais nobres*, **2009**, Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa.
10. Naya, Shin-ichi; Inoue, Aimi; Tada, Hiroaki; Journal of the American Society , **2010**, 132, 6292-6293.
11. Rodriguez-Lorenzo, Laura; M. Romo-Herrera, José; Perez-Juste, Jorge; Valvarez-Puebla, A. ; Liz-Marzán, Luis M.; Journal of Materials Chemistry, **2011**, 21, 11544.
12. http://www.ndted.org/EducationResources/CommunityCollege/Materials/Structure/metallic_structues.htm [citado 23 janeiro].
13. Jin R; Cao YC; Hao E; Métraux GS; Schatz GC; Mirkin CA, Nature, 2003, 425, 487-490.
14. <http://scienceblogs.com.br/massacritica/tag/nanotecnologia/> [citado 23 janeiro].
15. Maureen Rouhi, Chemical e Engineering News Archive, **2005**, 83(44), 8
16. Liu, Xiong; Atwater, Mark; Wangm, Jinhai; Huo, Qun; Elsevier, Colloids and Surfaces B: Biointerfaces,**2007**, 58, 3-7.
17. Sun, Wenfang; Dai, Qiu; Worden, James G; ,Huo Qun; Journal Physical Chemistry B, **2005**, 109 (44), 20854–20857
18. Mie, G., Beiträge zur Optik trüber Medien, speziell kolloidaler Metallösungen, Annalen der Physik **1908**, 330, 377

19. Nagarajan, R.; Hatton, T. Alan; *Nanoparticles: Synthesis, Stabilization, Passivation, and Functionalization*, **2008**, 996.
20. Hutter, Eliza; Fendler, Janos H.;, *Advanced Materials*, **2004**, 16, 1685-1708.
21. Link, S.; Wang, Z. L.; El Sayed, M. A; *Journal Physical Chemistry.*, **1999**, 103, 3529-3533.
22. Bastús, N.G., J. Comenge, and V.c. Puentes, *Langmuir*, **2011**, 27 (17),11098-11105
23. Hao, F., et al.,. *Nano Letters*, **2007**, 7(3), 729-732
24. Cui, Ye; Qingcheng, Kong; Rong, Wu; Zhiwu, Chen; Aiquig. Li, *Materials. Letters.*, **2010**,64, 1720-1723.
25. Chung-Hao, Wang; Chian-Wei, Chang; Ching-An, Peng, *Journal Nanoparticle Research.*,**2011**, 13, 2749-2758.
26. Sun, Yugang; Yin, Yadong; Mayers, Brian T.; Herricks, Thurston; Xia, Younan, *Chemistry of Materials.*, **2002**, 14, 4736-4745.
27. Jin R; Cao YC; Hao E; Métraux GS; Schatz GC; Mirkin CA, *Nature*, **2003**, 425, 487-490.
28. Instruments, M. <http://www.malvern.co.uk>, *Technical note*. [acedido a 3 de janeiro de 2013]
29. Eustis, S. and M.A. El-Sayer, *Chemical Society Reviews*, **2006**, 35 (3), 209-217.
30. Gomes, Inês; Santos, Nuno C.; Oliveira, Luís M. A.; Quintas, Alexandre; Eaton, Peter; Pereira, Eulalia; Franco, Ricardo; *Journal Physical Chemistry*, **2008** ,112, 16340-16347.
31. Xia, Y., et al., *Angewandte Chemie International Edition*, **2009**, 48 (1), 60-103.
32. Manuel García-Ruiz, J. *Journal of Structural Biology*, **2003**, 142 (1), 22-31.
33. Chayel, N.E., *Current Opinion in Structural Biology*, **2004**, 14 (5), 577-583.
34. Turkevich , J., P. C. Stevenson, and J. Hillier, *Discussions of the Faraday Society*, **1951**, 11, 55-75.
35. Senthil Kumar, P., et al, *Nanotechnology*, **2007**,19 (1),015606.
36. Barbosa, S., et al.. *Langmuir*, **2010**, 26 (18), 14943-50.
37. Yuan, Hsiangkuo; Khoury, Christopher G; Hwang, Hanjun; Wilson, Christy M; Grant, Gerald A; Vo-Dinh, Tuan; *Nanotechnology*, **2013**, 23, 075102
38. Daniel, M. C.; Astruc, D., *Chemistry Review* **2004**, 104 (1), 293-346.
39. You, C. C.; Verma, A.; Rotello, V. M., *Soft Matter* **2006**, 2 (3), 190-204.
40. Rodriguez-Lorenzo, Laura; M. Romo-Herrera, José; Perez-Juste, Jorge; Valvarez-Puebla, A. ; Liz-Marzán, Luis M.; *Journal Materials Chemistry*, **2011**, 21, 11544.

41. Rosa, R., *Incorporação de nanopartículas de prata em matrizes de nanofibras de polivinilpirrolidona e avaliação do seu potencial antibacteriano*, **2012**, Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa;
42. Yang, S.T., Small, **2013**, 9 (9-10), 1635-53;
43. Ismaya, W. T.; Rozeboom, H. J.; Weijn, A.; Mes, J. J.; Fusetti, F.; Wichers, H. J.; Dijkstra, B.W., *Biochemistry-Us* **2011**, 50 (24), 5477-5486.
44. Wichers, H. J.; Recourt, K.; Hendriks, M.; Ebbelaar, C. E. M.; Biancone, G.; Hoeberichts, F.A.; Mooibroek, H.; Soler-Rivas, C., *Microbiology Biotechnology* **2003**, 61 (4), 336-341.
45. Wu, J. J.; Chen, H. B.; Gao, J. Y.; Liu, X. A.; Cheng, W.; Ma, X. J., *Biotechnology Letters* **2010**, 32 (10), 1439-1447.
46. Strothkamp, K. G.; Jolley, R. L.; Mason, H. S., *Biochemical Biophysical Research Communications*, **1976**, 70 (2), 519-524.
47. Wichers, H. J.; Gerritsen, Y. A. M.; Chapelon, C. G. J., *Phytochemistry* **1996**, 43 (2), 333-337.
48. Flurkey, W. H.; Inlow, J. K., *Journal Inorganis Biochemistry* **2008**, 102 (12), 2160-2170.
49. <http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=2Y9W> [acedido a 31 de janeiro de 2013]
50. Siegbahn, P. E. M., *Journal Biological Inorganic Chemistry*, **2003**, 8 (5), 567-576.
51. Ismaya, W. T.; Rozeboom, H. J.; Weijn, A.; Mes, J. J.; Fusetti, F.; Wichers, H. J.; Dijkstra, B.W., *Biochemistry-Us*, **2011**, 50 (24), 5477-5486.
52. Pernes, T., *Desenvolvimento de bionanoconjugados com nanopartículas de ouro e oxidase para a deteção de poluentes ambientais*, **2012**, Faculdade de Ciências e Tecnologias da Universidade Nova de Lisboa.
53. Kaye, Wilbur; Barber, Duane; Marasco, Robert; *Analytical Chemistry*, **1980**, 52 (3), 437-442;
54. Haiss, Wolfgang; Thanh, Nguyen T. K.; Aveyard, Jenny; Fernig, David G.; *Analytical Chemistry*, **2007**, 79, 4215-4221
55. Goldstein, J., Newbury, D.E., Joy, D.C., Lyman, C.E., Echlin, P., Lifshin, E., Sawyer, L., Michael, J.R., *Scanning Electron Microscopy and X-ray Microanalysis*, 3^a edition, Springer, **2003**;
56. P. Miller, Frederic; Vandome, Agnes F., John, McBrewster; *Dynamic Light Scattering*, VDM Publishing, **2010**;

57. Dasary, Samuel S. R; Senapati, Dulal; Singh, Anant Kumar; Anjaneyulu, Yerramilli; Yu, Hongtao; Ray, Paresh Chandra; *Applied Materials & Interface*, **2010**, 2 (12), 3455-3460
58. Hunter, R. J.; *Zeta Potential in Colloid Science: Principles and Applications*, Academic Press, 1981. Thielbeer, Frank; Donaldson, Ken; Bradley, Mark; *Bioconjugate Chemistry*, **2011**, 22, 144-150
59. http://www.alfatest.it/public/images/zeta_potential_schematic.png (acedido a 17 maio 2014)
60. Heide, Paul van der; *X-ray Photoelectron Spectroscopy: An introduction to Principles and Practices*, Wiley, **2011**;
61. Sarma, D. D; Santra, Pralay K.; Mukherjee, Sumanta; Nag, Angshuman; *Chemistry Materials*, **2013**, 25, 1222–1232
62. Arancon, Rick Arneil D.; Lin, Sandra H. T.;, Chen, Grace; Lin, Carol Sze Ki; Lai, Jianping; Xu, Guobao; Luque, Rafael; *RSC Advance*, **2014**, 4, 17114-17119
63. www.nanosight.com/technology/nanoparticle-tracking-analysis-nta (acedido à 13 Maio de 2014).
64. Shirley, D. A., *Physical Review B*, **1972**, 5, 4709-4716
65. Sarma, D. D; Santra, Pralay K.; Mukherjee, Sumanta; Nag, Angshuman; *Chemistry Materials*, **2013**, 25, 1222–1232
66. Rodriguez-Lorenzo, Laura; Romo-Herrera, Jose M.; Perez-Juste, Jorge; Alvarez-Puebla, Ramon A.; Liz-Marzan, Luis M.; *Journal. Materials. Chemistry.*, **2011**, 21, 11544–11549
67. Hinterwirth, Helmut; Kappel, Stefanie; Waitz, Thomas; Prohaska, Thomas; Lindner, Wolfgang; Lammerhofer, Michael; *ACS Nano*, **2013**, 7 (2), 1129-1136.
68. Sarma, D. D; Santra, Pralay K.; Mukherjee, Sumanta; Nag, Angshuman; *Chemistry Materials*, **2013**, 25, 1222–1232
69. Cortez, J.; Vorobieva, Gralheira, D.; Osório, I.; Soares, L.; Vale, N.; Pereira, E.; Gomes P.; Franco, R; *Journal of nanoparticle Research*, 2010, 13, 1101-1113.
70. Stera, Geraldo; Immergut, E.H.; *Journal American Chemical Society*, **1954**, 76 (5), 1393-139.
71. http://srdata.nist.gov/xps/elm_Spectra_query.aspx?Elm1=Au&LD1=4f5%2f2&Elm2=S&LD2=2s&Elm3=&LD3=&Elm4=&LD4=&sType=PE [acedido dezembro de 2013]
72. <http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=2Y9W> [acedido em 27 maio]
73. Ismaya, W.T.; Rozeboom, H.J.; Weijn, A.; Mes, J.J.; Fusetti, F.; Wichers, H.J.; Dijkstra, B.W.; *Biochemistry*, **2011**, 50(24), 5477-5486

74. Ou, Yen-Yu ; Huang, Michael H., Journal Physical Chemistry B., **2006**, 110 (5), pp 2031–2036
75. Lo, Pik Kwan; Altvater, Florian; Sleiman, Hanadi F.; Journal American Chemical Society., **2010**, 132 (30), pp 10212–10214